



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2008 – 2009

STRATEGIEËN MET BETREKKING TOT DE
PROCESOPTIMALISATIE VAN ANAEROBE
VERGISTING

Marianne Smits

Promotor : Prof. dr. ir. Willy Verstraete
Co-promotor: dr. ir. Marta Carballa Arcos

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
BIO-INGENIEUR IN DE CHEMIE- EN BIOPROCESTECHNOLOGIE



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2008 – 2009

STRATEGIEËN MET BETREKKING TOT DE
PROCESOPTIMALISATIE VAN ANAEROBE
VERGISTING

Marianne Smits

Promotor : Prof. dr. ir. Willy Verstraete
Co-promotor: dr. ir. Marta Carballa Arcos

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
BIO-INGENIEUR IN DE CHEMIE- EN BIOPROCESTECHNOLOGIE

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan 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 te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

“The author and the promoter authorize consultation and partial reproduction of this thesis for personal use. Any other reproduction or use is subject to copyright protection, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.”

Gent, juni 2009

De promotor,

De co-promotor,

De auteur,

Prof. dr. ir. Willy Verstraete

dr. ir. Marta Carballa Arcos

Marianne Smits

Dankwoord

Wat u nu in handen hebt, is het resultaat van een intensief en boeiend jaar. Meer nog dan deze pagina's, is het de tocht ernaartoe die mij veel heeft geleerd en die het een onvergetelijke ervaring maakt. Het afgelopen jaar hebben er heel wat mensen een stukje meegewandeld op mijn thesispad, waarvoor ik ze bij deze van harte zou willen bedanken.

Prof. Verstraete, u stroomt over van aanstekelijk enthousiasme en weet steeds weer het vuur aan de onderzoekslont te steken. Bedankt voor de mogelijkheden die u me geboden hebt in uw labo en om me te laten proeven van uw begeesterende passie voor onderzoek. Dankzij u heb ik de smaak te pakken gekregen!

Muchas gracias Marta! Als ik de bomen door het bos niet meer zag, was je er steeds om het geheel weer overzichtelijk te maken. Je stimulerende kracht zorgde na elke vergadering voor een boost in de juiste richting en je hebt me een positieve manier van aanpak geleerd die me nog vaak van pas zal komen. Ik apprecieer het daarnaast ook enorm dat je de moeite hebt gedaan om je door al mijn Nederlandstalige teksten te worstelen, bedankt voor alles!

谢谢您, bedankt Echo om mijn eerste stappen tussen de anaerobe vergisters en CZV-stalen te begeleiden. Ik heb veel van je geleerd het afgelopen jaar en genoot ook van het vertrouwen dat je me schonk om zelfstandig mijn weg te zoeken.

Prof. Boon, bedankt om uw kostbare tijd te investeren om een verhelderend licht te werpen op mijn uitstap naar de microbiële wereld in deze thesis. Dankzij uw aanmoediging bleek er meer mogelijk dan ik ooit gedacht had.

De catering voor mijn reactoren werd verzorgd door Pieter VDC, dankjewel daarvoor! Slib, keukenafval, berekeningen of flipflopsystemen, geen vraag was je teveel of het werd naar de Coupure aangevoerd.

Varvara, je was mijn engelbewaarder in het moleculaire labo en hebt me met het nodige engelengeduld aangeleerd wat het belang is van nauwgezet werken. De moleculaire microliters vormden een groot contrast met de liters voeding die mijn reactoren in de kelder geserveerd kregen, maar dat maakte het een boeiende uitdaging.

Merci Tom H om een tipje van de bio-palladium-sluier op te lichten. Yu en Loïs leerden me dan weer de kneepjes van het vak om de sluwe Archaea in een gel te krijgen en Claudia bracht vanuit Uruguay interessante microbiële inzichten mee. Bedankt om jullie kennis met mij te delen.

Rita, Ellen, Greet, Charlotte, Lutgart, Renee, David, Tim, Siska en alle andere ervaringsdeskundigen in het labo, jullie zijn ontzettend bedankt voor alle tips, ontelbare VVZ-analyses, de Wiki, DGGE-hulp en nog zoveel meer. Jullie helpende handen maakten van het dagelijkse leven in het labo een aangename tijd!

Praktische probleempjes werden steeds met de glimlach opgelost door de drie behulpzame dames die het kloppende hart van LabMET bevolken. Dankjewel aan Christine, Regine en Annelies van het secretariaat.

Mario van S4 bis maakte het mogelijk om mijn reactoren op een hogere versnelling te schakelen met prachtige zelfgemaakte propellers. Die opwaardering van CTR naar CSTR hebben ze volledig aan u te danken!

Ik wil ook zeker mijn medestudenten bedanken om van de vele thesisuurtjes in de catacomben en hogere regionen van LabMET een fijne tijd te maken. In het bijzonder Kris als bondgenoot in de anaerobe vergisting en Hang, I am glad we worked together this year! En hoewel ik vele LabMET-deuren als het ware heb platgelopen dit jaar, ben ik de desbetreffende kantoorbewoners zeer dankbaar dat ik altijd met open armen ontvangen werd ongeacht het aantal bezoeken.

Dank ook aan alle vrienden die voor de broodnodige ontspanning zorgden! Ik ben trots op alle UA-vrienden dat het ons samen gelukt is om op tijd een roze thesis in te leveren. Hopelijk mogen er nog vele Gentse/Antwerpse etentjes volgen. Dat KLJ voor stralende ogen en een lachende mond zorgt, is des te meer bewezen dit jaar. Merci allemaal voor de nodige porties ontspanning en relativering. En ik was ook heel blij met de aanmoedigingen die ik kreeg van de L&L-ers, jullie zijn het beste voorbeeld dat alles mogelijk is als je er maar in gelooft.

Uiteraard ben ik in het bijzonder mijn ouders en grote zus ontzettend dankbaar voor de onvoorwaardelijke steun en hulp, het is fijn om zo'n warme thuisbasis te hebben. Bedankt om steeds in mij te geloven en om dit alles mogelijk te maken!

Aartselaar, juni 2009

Marianne Smits

Lachend kan men duizend dingen doen die met tranen onmogelijk zijn.

F. Schiller

Samenvatting

De visie op afvalbehandeling zal de komende jaren drastisch veranderen van een controle op de vervuiling naar een recuperatie en valorisatie van waardevolle grondstoffen. Anaerobe vergisting levert in dit opzicht een belangrijke bijdrage, aangezien het de mogelijkheid biedt om organisch afval om te zetten in biogas. De industriële toepassingen van anaerobe vergisting worden echter gelimiteerd door enkele obstakels zoals substraten die moeilijk vergisten en traag herstel van slecht werkende reactoren. Bovendien is optimalisatie van het algemene anaerobe proces nog steeds wenselijk.

Dit eindwerk is toegespitst op de verwerking van keukenafval in continue vergisters. De praktijk leert dat dit substraat vaak aanleiding geeft tot variabele en zelfs gebrekkige werking van de anaerobe reactoren. De oorzaken hiervan zijn nog niet uitgeklaard. In onze reactoren op laboschaal was de maximale organische volumetrische belasting die behaald kon worden bij een hydraulische verblijftijd van 18 dagen van de grootte-orde van $2 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dit resultaat was analoog voor mesofiele en thermofiele reactoren en aldus effectief beperkt gezien de huidige anaerobe reactoren vaak kunnen toegepast worden aan snelheden die twee tot vijf maal hoger liggen. In dit eindwerk brachten veranderingen van het reactordesign geen verbetering. Na implementatie van een mengsysteem en het bevorderen van biomassa-retentie door decantatie van het effluent werden gelijkaardige resultaten behaald. Propionzuurconcentratie, biogasproductie en Ripley-index (indicator voor verhouding tussen vetzuren en buffercapaciteit in reactor) werden geschikte parameters bevonden om de reactorwerking te karakteriseren. Verder onderzoek is aangewezen om de voorspellende kracht ten aanzien van de toekomstige toestand van de reactor te beschrijven.

Om meer inzicht te krijgen in de evolutie van het anaerobe proces, werd de microbiële gemeenschap van *Bacteria* en *Archaea* onderzocht in de reactoren. Om de species te beschrijven, werd gebruik gemaakt van de microbial-resource-management parameters, namelijk rijkheid, functionele organisatie en dynamica. Voor de *Bacteria* was er een duidelijke correlatie tussen deze microbiële parameters en de Ripley-index als procesparameter. Een goede reactorwerking kwam overeen met een goede microbiële gemeenschap en wanneer de species uit evenwicht raakten, werd dit weerspiegeld in een gebrekkige vergisting. Wat betreft de *Archaea* en de biogasproductie werd echter geen correlatie teruggevonden. Dit geeft aan dat verder onderzoek naar het werkingsproces en de correlatie met microbiële parameters noodzakelijk is. Evenwel is de duiding bekomen met deze microbiële benadering grensverleggend en belovend.

Een belangrijk hiaat in de huidige kennis rond vergisting is het in situ herstellen van gefaalde reactoren. Toevoegen van ijzersulfaat of micronutriënten kon geen verbetering brengen in de bestudeerde reactoren met een falende biogasproductie. Een theoretische berekening toonde aan dat ammoniumtoxiciteit niet kan verholpen worden door diffusieve afvoer van ammoniak via siliconenmembranen. Preventie van falen blijft dus de beste strategie.

Tot slot werd gezocht naar een strategie om het anaerobe proces in goed functionerende reactoren te optimaliseren. Calciumperoxide als potentiële micro-aerator had een negatieve invloed op de biogasproductie door zijn hoog oxiderend vermogen. Gereticuleerd polyurethaanschuim bracht eveneens in het uitgevoerde experiment geen verbetering. Palladium in lage concentraties ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) en bio-palladium aan een concentratie van 1 mg L^{-1} daarentegen bleken een gunstige invloed te hebben op de biogasproductie in het geval van een zeer hoge belasting. Dit effect dient verder onderzocht te worden. De vinding dat het waterstof-reactieve palladium als ion of als Pd(0) sturend kan zijn in de complexe metabole omzettingen van organisch materiaal in het biomethanatie proces is zonder meer nieuw. Dit kan interessante mogelijkheden inhouden voor het optimaliseren van de waterstof-transferprocessen in anaerobe reactoren.

Abstract

The vision on waste treatment will change drastically in the coming years from a control of pollution to a valorization of valuable resources. Anaerobic digestion can make an important contribution to this change, because it offers the opportunity to convert organic waste into biogas. However, the industrial applications of anaerobic digestion are limited by some obstacles like substrates which are hard to digest and slow recovery of reactors from bad performance events.

This thesis concentrates on the treatment of kitchen waste in continuous anaerobic digesters. This substrate induces a variable and poor operation of the anaerobic digesters. The causes are disputable. In our laboratory reactors, the maximum achievable organic loading rate was about 2 g COD L⁻¹ d⁻¹ with a hydraulic retention time of 18 days. This result was similar in the mesophilic and thermophilic reactors. Moreover changes in reactor design did not result in an improvement, since the reactors operation was similar after implementation of a mixing system and the enhancement of the biomass retention in the reactors by decanting the effluent. Propionic acid concentration, biogas production and the Ripley-index (ratio between free fatty acids and the buffer capacity of the reactor) were suitable parameters to characterize the actual reactor performance. Their power to predict the future state of the reactor needs to be further explored.

To gain more insight in the evolution of the anaerobic process, the microbial community of *Bacteria* and *Archaea* were investigated in the reactors. These species were described by using the microbial resource management parameters, namely richness, functional organization and dynamics. For the *Bacteria* there was a clear correlation between the molecular parameters and the Ripley index as process parameter. A good reactor performance corresponds with a stable microbial community. When the species become unbalanced, this is reflected in a poor digestion. Concerning the *Archaea* and the biogas production there was no correlation. This indicates that future research about the link of the anaerobic process with the molecular parameters is still a challenge. Yet, the overall findings of the molecular approach are pioneering and promising.

An important gap in the current knowledge about digestion is the in situ recovery of failed reactors. Addition of iron sulphate or micronutrients did not improve the investigated reactors with a failed biogasproduction. A theoretical calculation showed that it is not possible to remedy ammonium toxicity with diffusive removal of ammonia by silicone membranes.

The last objective was to search for a strategy to optimize the anaerobic process in general. Calciumperoxide as micro-aerator had a negative influence on the biogas production because of its high oxidation capacity. Reticulated polyurethane foam did not improve the digestion in the tested circumstances. On the other hand palladium at a low concentration (10 µg L⁻¹) and bio-palladium at a concentration of 1 mg L⁻¹ had a positive influence on the biogas production when high loading rates were applied. This effect must be further investigated. The finding that the hydrogen-reactive palladium as an ion or as Pd(0) can have steering effect on the complex metabolic conversions of organic material in the biomethanation process is new and can lead to interesting possibilities for the optimization of the hydrogen transfer processes in anaerobic reactors.

Inhoudstafel

Dankwoord.....	I
Samenvatting.....	III
Abstract.....	V
Inhoudstafel	VI
Lijst met gebruikte afkortingen	X
Lijst met figuren	XII
Lijst met tabellen.....	XIV
Deel I: Literatuurstudie	1
Hoofdstuk 1 Anaerobe vergisting	1
1.1 Inleiding	1
1.2 Voor- en nadelen van anaerobe vergisting	1
1.3 Microbiële gemeenschap	2
1.4 Omgevingsfactoren	7
1.5 Reactortypes	10
1.6 Anaerobe vergisting van keukenafval	12
Hoofdstuk 2 Inhibitie.....	14
2.1 Ammonium/ammoniak.....	14
2.2 Natrium	16
2.3 Sulfide.....	16
2.4 Overige inhibitoren	17
Hoofdstuk 3 Optimalisatietechnieken.....	18
3.1 Macro- en micronutriënten	18
3.2 Micro-aeratie.....	19
3.3 Polyurethaanschuur.....	19
3.4 (Bio-)palladium	20
Deel II: Doelstellingen	21
Deel III: Materiaal en methoden	22
Hoofdstuk 1 Fysisch-chemische analysemethoden.....	22
1.1 Chemisch zuurstof verbruik.....	22
1.2 Droge stof, vervluchtigbare stoffen, totaal gehalte aan stoffen in suspensie en vervluchtigbare stoffen in suspensie	22
1.3 pH.....	22

1.4	Alkaliniteitsmeting.....	23
1.5	Vluchtige vetzuren.....	23
1.6	Natriumconcentratie.....	23
1.7	Stikstofconcentratie.....	24
1.8	Ijzer- en calciumconcentratie.....	24
1.9	Anionenanalyse.....	24
Hoofdstuk 2	Gasbepalingen.....	25
2.1	Biogasproductie.....	25
2.2	Methaan- en koolstofdioxideconcentratie.....	25
Hoofdstuk 3	Microbiële analysemethoden.....	25
3.1	DNA-extractie.....	25
3.2	PCR.....	26
3.3	Agarose gel elektroforese.....	26
3.4	DGGE.....	27
3.5	Statistische analyses.....	27
Hoofdstuk 4	Bio-palladium productie.....	29
4.1	Stockoplossingen en media.....	29
4.2	Opgroeien en oogsten van <i>Shewanella oneidensis</i>	29
4.3	Microbiële reductie van palladium.....	30
Hoofdstuk 5	Experimentele opstellingen.....	30
5.1	Continue tank reactoren.....	30
5.2	Batchreactoren.....	32
Deel IV: Resultaten		36
Hoofdstuk 1	Anaerobe vergisting van keukenafval.....	36
1.1	CTR A: Thermofiele controlereactor, constante OVB van ongeveer 2 g CZV L ⁻¹ d ⁻¹	36
1.2	CTR B: Thermofiele behandelingsreactor met stijgende OVB.....	39
1.3	CTR C: Mesofiele controlereactor, constante OVB van ongeveer 2 g CZV L ⁻¹ d ⁻¹	42
1.4	CTR D: Mesofiele behandelingsreactor met stijgende OVB.....	45
1.5	Totale VVZ- en azijnzuurconcentratie.....	48
1.6	Totale alkaliniteit.....	49
1.7	Ammoniumconcentratie.....	49
1.8	DS en VS concentratie.....	50
Hoofdstuk 2	Optimalisatie door verandering in reactordesign.....	51
2.1	CSTR C: Mesofiele controlereactor, constante OVB van ongeveer 2 g CZV L ⁻¹ d ⁻¹	51
2.2	CSTR D: Mesofiele behandelingsreactor met stijgende OVB.....	54
2.3	Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties.....	57
2.4	Totale alkaliniteit.....	57
2.5	Ripley-index.....	57

2.6	DS en VS concentratie	58
2.7	Anionen- en kationenconcentraties.....	58
Hoofdstuk 3	Microbiële analyses	59
3.1	Karakterisering stalen.....	59
3.2	DNA-extractie	60
3.3	PCR en DGGE <i>Bacteria</i>	61
3.4	Interpretatie resultaten DGGE <i>Bacteria</i>	61
3.5	DGGE <i>Archaea</i>	66
3.6	Interpretatie resultaten DGGE <i>Archaea</i>	66
3.7	Samenvatting microbiële analyses.....	70
Hoofdstuk 4	Herstel van gefaalde reactoren.....	72
4.1	Ijzersulfaat	72
4.2	Micronutriënten in de vorm van methanostim liquide	72
4.3	Ammoniumverwijdering met behulp van membranen.....	77
Hoofdstuk 5	Optimalisatie van anaerobe vergisting	79
5.1	Micronutriënten in de vorm van methanostim liquide	79
5.2	Micro-aeratie door calciumperoxide	82
5.3	Gereticuleerd polyurethaanschuim	82
5.4	Palladium.....	83
5.5	Bio-palladium.....	84
Deel V: Discussie.....		85
Hoofdstuk 1	Anaerobe vergisting van keukenafval.....	85
1.1	Controle versus behandeling	85
1.2	Mesofiel versus thermofiel.....	87
1.3	CTR versus CSTR.....	87
1.4	Evaluatie parameters falende reactoren	88
1.5	Besluit: Anaerobe vergisting van keukenafval	91
Hoofdstuk 2	Microbiële analyses	92
2.1	Microbial resource management.....	92
2.2	<i>Bacteria</i>	93
2.3	<i>Archaea</i>	96
2.4	<i>Archaea</i> versus <i>Bacteria</i>	97
2.5	Besluit: Microbiële analyses.....	97
Hoofdstuk 3	Herstel van gefaalde reactoren.....	98
3.1	Ijzersulfaat	98
3.2	Micronutriënten.....	98
3.3	Ammoniumverwijdering.....	99
3.4	Besluit: Herstel van gefaalde reactoren.....	99

Hoofdstuk 4	Optimalisatie van anaerobe vergisting	100
4.1	Micronutriënten.....	100
4.2	Micro-aeratie door calciumperoxide	101
4.3	Gereticuleerd polyurethaanschuim	101
4.4	Palladium.....	101
4.5	Bio-palladium.....	102
4.6	Besluit: Optimalisatie van anaerobe vergisting.....	103
Deel VI: Besluiten en verder onderzoek		104
Hoofdstuk 1	Algemene besluiten	104
Hoofdstuk 2	Voorstellen voor verder onderzoek.....	106
Referenties		108

Lijst met gebruikte afkortingen

AAS	Atoom absorptie spectrofotometer
ATP	Adenosine triphosphate (<i>adenosinetrifosfaat</i>)
BSA	Bovine serum albumine
CCD	Charge coupled device
CFU	Colony forming unit (<i>kolonie vormende eenheid</i>)
CZV	Chemische zuurstofverbruik (<i>chemical oxygen demand</i>)
CZVs	Chemische zuurstofverbruik in oplossing
CZVt	Totale chemische zuurstofverbruik
CSTR	Continuous stirred tank reactor (<i>continu geroerde tankreactor</i>)
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
CTR	Continue tank reactor
DEPC	Diethylpyrocarbonaat
DGGE	Denaturerende gradiënt gel elektroforese
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP	Deoxyribonucleotide trifosfaat
DS	Droge stof (<i>total solids</i>)
Dy	Dynamiek van verandering
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EGSB	Expanded granular sludge bed
GC	Gaschromatografie
F ₂₀	Cumulatieve abundantie van 20% meest voorkomende species
FID	Flame ionization detector (<i>vlamionisatie detector</i>)
Fo	Functionele organisatie
HPr	Propionzuur
HRT	Hydraulic retention time (<i>hydraulische verblijftijd</i>)
IA	Intermediaire alkaliniteit
IC	Interne circulatie
ICP-OES	Inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy
K _a	Dissociatieconstante voor zuur

K _H	Henry constante
LB-medium	Luria Bertani-medium
LCFA	Long chain fatty acids (<i>lange keten vetzuren</i>)
M	Merker
M9	Minimaal medium
ML	Methanostim liquid (ML-A: 8% citraat, ML-B: 12% citraat)
MRM	Microbial resource management
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
OD	Optische densiteit
OTU	Operationele taxonomische eenheid
OVB	Organische volumetrische belasting
PA	Partiële alkaliniteit
PCB	Polychloorbifenylen
PCR	Polymerase chain reaction
PDMS	Polydimethylsiloxaan
PEG	Polyethyleen glycol
R _r	Bereik-gewogen rijkheid
rRNA	Ribosomaal ribonucleïnezuur
RWZI	Rioolwaterzuiveringsinstallatie
SBR	Sequentiële batch reactor
SRB	Sulfaat reducerende bacteriën
TAE	Trisacetaat-ethyleendiaminetetra-azijnzuur
TAN	Totale ammoniakale stikstof
TCD	Thermal conductivity detector
tRFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism
TSS	Totaal gehalte aan stoffen in suspensie
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
UV	Ultraviolet
VS	Vervluchtigbare stoffen
VSS	Vervluchtigbare stoffen in suspensie
VVZ	Vluchtige vetzuren

Lijst met figuren

Figuur 1: Anaerobe afbraakroutes van organisch materiaal.....	2
Figuur 2: Gemiddelde samenstelling van keukenafval uitgedrukt in gewichtspercentages	13
Figuur 3: Transmissie elektron microscopische foto van nulwaardige palladium partikels op de celwand van <i>Shewanella oneidensi</i>	20
Figuur 4: Verschillende Lorenz-curven en de overeenkomstige Gini-coëfficiënt	28
Figuur 5: Verband tussen de absorbantie bij 610 nm en de celconcentratie (CFU mL ⁻¹)	30
Figuur 6: Opstelling CSTR-reactoren.....	31
Figuur 7: Opstelling batchreactoren.....	32
Figuur 8: Organische volumetrische belasting en CZV verwijderingssnelheid voor de thermofiele controlereactor CTR A.....	37
Figuur 9: Gemeten biogasproductie en theoretisch berekende biogasproductie voor de thermofiele controlereactor CTR A.....	37
Figuur 10: Residuele CZVt en CZVs concentratie in het effluent van de thermofiele controlereactor CTR A.....	38
Figuur 11: Propionzuurconcentratie in het effluent van de thermofiele controlereactor CTR A....	38
Figuur 12: Organische volumetrische belasting en CZV verwijderingssnelheid voor de thermofiele behandelingsreactor CTR B.....	40
Figuur 13: Gemeten biogasproductie en theoretisch berekende biogasproductie voor de thermofiele behandelingsreactor CTR B.....	40
Figuur 14: Residuele CZVt en CZVs concentratie in het effluent van de thermofiele behandelingsreactor CTR B.....	41
Figuur 15: Propionzuurconcentratie in het effluent van de thermofiele behandelingsreactor CTR B	41
Figuur 16: Organische volumetrische belasting en CZV verwijderingssnelheid voor de mesofiele controlereactor CTR C	43
Figuur 17: Gemeten biogasproductie en theoretisch berekende biogasproductie voor de mesofiele controlereactor CTR C.....	43
Figuur 18: Residuele CZVt en CZVs concentratie in het effluent van de mesofiele controlereactor CTR C.....	44
Figuur 19: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele controlereactor CTR C.....	44
Figuur 20: Organische volumetrische belasting en CZV verwijderingssnelheid voor de mesofiele behandelingsreactor CTR D.....	46
Figuur 21: Gemeten biogasproductie en theoretisch berekende biogasproductie voor de mesofiele behandelingsreactor CTR D	46
Figuur 22: Residuele totale CZV concentratie en oplosbare CZV concentratie in het effluent van de mesofiele behandelingsreactor CTR D.....	47
Figuur 23: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele behandelingsreactor CTR D	47
Figuur 24: Organische volumetrische belasting en CZV verwijderingssnelheid voor de mesofiele controlereactor CSTR C.....	52
Figuur 25: Gemeten biogasproductie en theoretisch berekende biogasproductie voor de mesofiele controlereactor CSTR C	52

Figuur 26: Residuele totale CZV concentratie en oplosbare CZV concentratie in het effluent van de mesofiele controlereactor CSTR C	53
Figuur 27: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele controlereactor CSTR C....	53
Figuur 28: Organische volumetrische belasting en CZV verwijderingssnelheid voor de mesofiele behandelingsreactor CSTR D	55
Figuur 29: Gemeten biogasproductie en theoretisch berekende biogasproductie voor de mesofiele behandelingsreactor CSTR D.....	55
Figuur 30: Residuele totale CZV concentratie en oplosbare CZV concentratie in het effluent van de mesofiele behandelingsreactor CSTR D.....	56
Figuur 31: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele behandelingsreactor CSTR D	56
Figuur 32: DGGE-patroon van <i>Bacteria</i> aanwezig in CTR en CSTR-reactoren.....	61
Figuur 33: Correlatie tussen DGGE-patronen voor <i>Bacteria</i> in thermofiele en mesofiele reactoren	62
Figuur 34: Lorenz-curven voor <i>Bacteria</i> in thermofiele reactoren CTR A en CTR B	63
Figuur 35: Lorenz-curven voor <i>Bacteria</i> in mesofiele controlereactoren CTR C en CSTR C	63
Figuur 36: Lorenz-curven voor <i>Bacteria</i> in mesofiele behandelingsreactoren CTR D en CSTR D	63
Figuur 37: Correlatie tussen Gini-coëfficiënt <i>Bacteria</i> en Ripley-index in mesofiele CSTR-reactoren.....	65
Figuur 38: Correlatie tussen rijkheid <i>Bacteria</i> en Ripley-index in mesofiele CSTR-reactoren.....	65
Figuur 39: Correlatie tussen Gini-coëfficiënt en rijkheid <i>Bacteria</i> in mesofiele en thermofiele CTR en CSTR-reactoren	65
Figuur 40: DGGE-patroon van <i>Archaea</i> aanwezig in CTR en CSTR-reactoren	66
Figuur 41: Correlatie tussen DGGE-patronen voor <i>Archaea</i> in thermofiele en mesofiele CTR en CSTR-reactoren	67
Figuur 42: Lorenz-curven voor <i>Archaea</i> in thermofiele reactoren	68
Figuur 43: Lorenz-curven voor <i>Archaea</i> in mesofiele controlereactoren CTR C en CSTR C.....	68
Figuur 44: Lorenz-curven voor <i>Archaea</i> in mesofiele behandelingsreactoren CTR D en CSTR D	68
Figuur 45: Correlatie tussen Gini-coëfficiënt en rijkheid voor <i>Archaea</i> in mesofiele CTR en CSTR-reactoren.....	70
Figuur 46: Cumulatieve biogasproductie mesofiele batchreactoren met ML dosering	73
Figuur 47: Cumulatieve biogasproductie thermofiele bathreactoren met ML dosering.....	75
Figuur 48: Resultaten controlereactor optimalisatie-effect ML	80
Figuur 49: Resultaten reactor behandeld met ML-A.....	80
Figuur 50: Resultaten reactor behandeld met ML-B.....	80
Figuur 51: Biogasproductie in de mesofiele reactoren met calciumperoxide en polyurethaan.....	82
Figuur 52: Biogasproductie in mesofiele batchreactoren met palladium.....	83
Figuur 53: Biogasproductie in de mesofiele reactoren met bio-palladium.....	84

Lijst met tabellen

Tabel 1: Verhoudingen die de anaerobe vergisting beïnvloeden	7
Tabel 2: Specifieke biogasopbrengst en methaanconcentratie per substraatcomponent	8
Tabel 3: Effect van TAN bij verschillende concentraties.....	15
Tabel 4: Indeling reactoren voor bestuderen van herstellend effect ML op gefaalde reactoren ...	33
Tabel 5: Indeling reactoren voor onderzoek naar optimalisatie van anaerobe vergisting	35
Tabel 6: Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties voor thermofiele CTR-reactoren (g L^{-1})	48
Tabel 7: Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties voor mesofiele CTR-reactoren (g L^{-1})	48
Tabel 8: Totale alkaliniteit in thermofiele reactoren CTR A en CTR B ($\text{g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	49
Tabel 9: Totale alkaliniteit in mesofiele reactoren CTR C en CTR D ($\text{g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	49
Tabel 10: Ammoniumconcentraties CTR-reactoren ($\text{g NH}_4^+ \text{ N L}^{-1}$)	49
Tabel 11: DS en VS concentraties voor thermofiele CTR-reactoren (g L^{-1})	50
Tabel 12: DS en VS concentraties voor mesofiele CTR-reactoren (g L^{-1})	50
Tabel 13: Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties voor de mesofiele CSTR-reactoren (g L^{-1})	57
Tabel 14: Totale alkaliniteit in mesofiele reactoren CSTR C en CSTR D ($\text{g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	57
Tabel 15: Ripley index voor de mesofiele CSTR-reactoren.....	58
Tabel 16: DS en VS waarden voor de mesofiele CSTR-reactoren (g L^{-1}).....	58
Tabel 17: Anionen- en kationenconcentraties in mesofiele CSTR-reactoren op dag 188 (mg L^{-1}).....	58
Tabel 18: Karakterisering van stalen uit CTR-reactoren.....	59
Tabel 19: Karakterisering van stalen uit CSTR-reactoren	59
Tabel 20: Concentratie en zuiverheid van geëxtraheerd DNA	60
Tabel 21: Similariteit voor <i>Bacteria</i> in CTR en CSTR-reactoren	64
Tabel 22: Dynamica <i>Bacteria</i> in CTR en CSTR-reactoren	64
Tabel 23: Similariteit voor <i>Archaea</i> in CTR en CSTR-reactoren	69
Tabel 24: Dynamica voor <i>Archaea</i> in CTR en CSTR-reactoren.....	69
Tabel 25: Samenvatting reactorparameters en microbiële parameters voor <i>Bacteria</i> en <i>Archaea</i> in mesofiele en thermofiele CTR en CSTR-reactoren	71
Tabel 26: pH waarden van mesofiele batchreactoren met ML dosering	72
Tabel 27: CZVs waarden van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L^{-1}).....	73
Tabel 28: CZVt waarden van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L^{-1})	74
Tabel 29: Propionzuurconcentraties van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g L^{-1}).....	74
Tabel 30: Azijnzuurconcentraties van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g L^{-1})	74
Tabel 31: pH waarden van thermofiele batchreactoren met ML dosering.....	75
Tabel 32: CZVs waarden van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L^{-1})	76
Tabel 33: CZVt waarden van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L^{-1})	76
Tabel 34: Propionzuurconcentraties van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g L^{-1})	76
Tabel 35: Azijnzuurconcentraties van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g L^{-1}).....	77
Tabel 36: Concentraties aan kationen en anionen in batchreactoren op dag 81 (mg L^{-1})	79
Tabel 37: Propionzuurconcentraties in batchreactoren optimalisatie-effect van ML (g L^{-1})	81

Deel I: Literatuurstudie

Hoofdstuk 1 Anaerobe vergisting

1.1 Inleiding

Afvalbehandeling werd tot dusver beschouwd als een hoge kost voor de maatschappij en de industrie zonder economische voordelen. Het Kyoto-protocol en de daaropvolgende Europese en nationale wetten ontstonden uit bezorgdheid voor het leefmilieu en de menselijke gezondheid. Dit waren ook de drijfveren om werk te maken van de behandeling van organisch afval in vloeibare en vaste vorm.

De komende jaren zal de visie op afvalbehandeling drastisch veranderen van een controle van de vervuiling naar een valorisatie van kostbare grondstoffen. Als afvalwater beschouwd wordt als een bron van herbruikbaar water, energie en andere waardevolle grondstoffen, kan waterzuivering eveneens een financieel voordeel opleveren. Binnen de principes van de duurzaamheid zal het doel zijn om organische pollutanten uit afval om te zetten tot geschikte energiedragers zoals methaan, waterstof en elektriciteit.

Anaerobe vergisting is in dit opzicht een geschikte technologie voor de transformatie van organisch materiaal naar hernieuwbare energie in de vorm van biogas. Doelstellingen van de Europese Unie hebben vooropgesteld om aan 20% van de Europese energiebehoeften tegemoet te komen met hernieuwbare energie tegen het jaar 2020. Minstens 25% van de bio-energie zal in de toekomst afkomstig zijn van biogas geproduceerd uit natte organische materialen zoals dierlijke mest en voeding- en voederafval (Holm-Nielsen et al., 2009).

1.2 Voor- en nadelen van anaerobe vergisting

Anaerobe vergisting is de afbraak en stabilisatie van organisch materiaal door micro-organismen onder anaerobe omstandigheden waarbij biogas en microbiële biomassa gevormd worden. Biogas bestaat uit methaan (50-75 %), koolstofdioxide (30-60%) en een klein percentage andere gassen zoals waterstofsulfide. De energie-inhoud van biogas is $6,0 \text{ kWh m}^{-3}$, waardoor het een interessante hernieuwbare grondstof is (Appels et al., 2008; Zeeman, 2008).

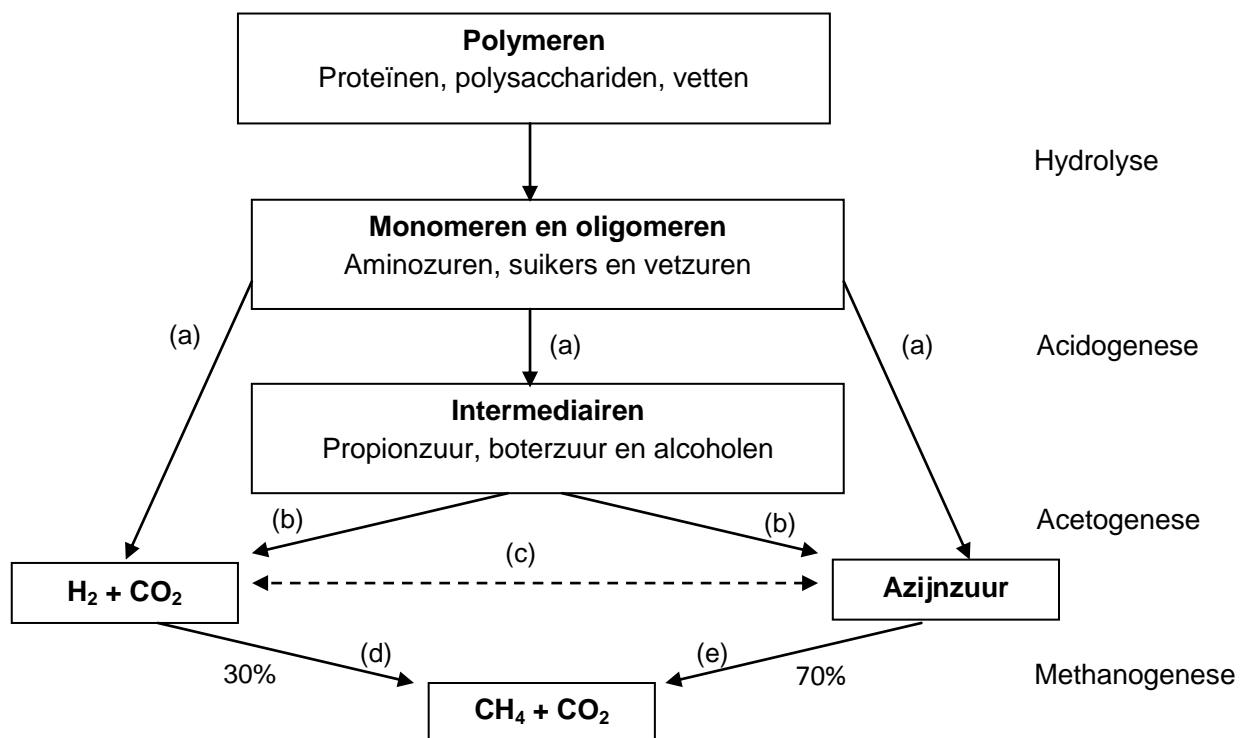
De voordelen van anaerobe vergisting zijn zeer uitgebreid. Het energieverbruik van anaerobe systemen is verwaarloosbaar. Meer zelfs; er wordt hoogwaardige, hernieuwbare energie geproduceerd in de vorm van biogas. Daarnaast is het slib goed gestabiliseerd en blijft de slibproductie beperkt. De hoeveelheid droge stof (DS) per kg verwijderde chemische zuurstofverbruik (CZV) is ongeveer één tiende in vergelijking met aerobe methodes. Verder zijn hoge volumetrische belastingen mogelijk en zijn er lage vereisten van nutriënten en chemicaliën.

Er vindt tevens afvalreductie plaats met hergebruik en recyclage van waardevolle bijproducten. Tot slot neemt deze behandeling minder plaats in beslag en is het meer kosteneffectief in vergelijking met een aerobe behandeling (vanStarkenburg, 1996; Lettinga, 2001; Aiyuk et al., 2006; Zeeman, 2008).

Lage stabiliteit wordt vaak aangehaald als limiterende factor voor toepassingen van anaerobe vergisting. De trage groei van anaerobe bacteriën resulteert in een lange opstartperiode en een hoge gevoeligheid voor omgevingscondities zoals pH, temperatuur en toxische componenten. Andere nadelen zijn een onvolledige pathogeenverwijdering en de vorming van waterstofsulfide indien hoge sulfaatconcentraties in het influent aanwezig zijn, wat kan leiden tot geurhinder. Nabehandeling is tot slot nodig om aan de lozingsnormen voor organisch materiaal, nutriënten en pathogenen te voldoen (Lettinga, 2001; Dupla et al., 2002; Steyer et al., 2006).

1.3 Microbiële gemeenschap

Bij de aerobe afbraak van organisch materiaal volstaat één reactiestap door een bepaald soort bacterie om het substraat om te zetten en daarin komt ook alle energie vrij. Voor de anaerobe afbraak is er een coöperatieve associatie van vijf verschillende groepen micro-organismen nodig en dient de vrijgekomen energie onder hen verdeeld te worden. In Figuur 1 worden de mogelijke afbraakroutes afgebeeld. Er zijn vier fasen te onderscheiden in het proces, namelijk hydrolyse, acidogenese, acetogenese en methanogenese (Angenent et al., 2004; Appels et al., 2008; Doublein en Steinhauser, 2008).



Figuur 1: Anaerobe afbraakroutes van organisch materiaal (Angenent et al., 2004)

1.3.1 Hydrolyse

De onoplosbare polymere substraten zoals proteïnen, vetten en polysacchariden worden in de eerste fase gehydrolyseerd tot oplosbare monomeren door fermentatieve bacteriën die extracellulaire enzymen (hydrolasen) produceren. De hydrolyse van koolhydraten gebeurt in enkele uren, maar voor proteïnen en vetten duurt dit enkele dagen (Deublein en Steinhauser, 2008). Een efficiënte hydrolyse is belangrijk om de complexe substraten beschikbaar te maken voor de anaerobe bacteriën om zo een maximale hoeveelheid biogas te produceren uit het organische afval. Bij particulier materiaal zal hydrolyse vaak de snelheidsbepalende stap zijn.

1.3.2 Acidogenese

Tijdens de acidogenese worden de gevormde monomeren zoals oplosbare sacchariden, aminozuren en glycerol, in de bacteriële cellen gefermenteerd. Dit resulteert in de vorming van korte-keten zuren zoals propionzuur en azijnzuur, alcoholen, CO₂ en H₂ (reactie a uit Figuur 1). Deze omzetting gebeurt in afwezigheid van een externe elektronacceptor.

De bacteriën die verantwoordelijk zijn voor hydrolyse zullen meestal ook de resulterende monomeren fermenteren (Schink, 1997). Deze bacteriën hebben een korte verdubbelingstijd, waardoor de acidogenese niet als limiterende stap in het anaeroob proces zal optreden.

1.3.3 Acetogenese

De fermentatieproducten (korte-keten vetzuren en alcoholen) en lange-keten vetzuren (onder andere afkomstig van hydrolyse van lipiden) worden verder geoxideerd tot azijnzuur of waterstof door obligaat H₂-producerende acetogenen (reactie b uit Figuur 1). Acetogenese omvat eveneens de productie van azijnzuur uit waterstof en koolstofdioxide door acetogenen (reactie c uit Figuur 1).

In aanwezigheid van anorganische elektronacceptoren naast protonen en CO₂, kan er competitie tussen verschillende substraten optreden. Dit is bijvoorbeeld het geval bij organisch afval dat sulfaat bevat, waardoor sulfaatreducerende bacteriën in competitie zullen treden met de syntrofe acetogene bacteriën voor elektronen afkomstig van vetzuren en met methanogenen voor de elektronen afkomstig van waterstof en acetaat (Colleran et al., 1995).

1.3.4 Methanogenese

Methanogene *Archaea* produceren methaan uit de eindproducten van de vorige reacties (voornamelijk waterstof, CO₂, formiaat, methanol en acetaat). Bij afvalstromen in oplossing is de methanogenese de zwakste schakel (Huang et al., 2003).

Methaanproductie gebeurt door twee soorten *Archaea*.

1. Acetotrofen zetten azijnzuur om tot methaan door een klievingsreactie (reactie e uit Figuur 1). Deze acetoclastische weg is verantwoordelijk voor 70% van de methanogenese (Angenent et al., 2004; Karakashev et al., 2006).
2. De hydrogenotrofen vormen methaan door reductie van CO₂ met het aanwezige H₂. (reactie d uit Figuur 1)

1.3.5 Syntrofische relatie tussen acetogenese en methanogenese

De acetogenese is slechts onder gelimiteerde omstandigheden thermodynamisch gunstig. Een negatieve vrije energie voor de acetogenese wordt enkel bereikt wanneer de waterstofconcentraties binnen een bereik liggen van 10⁻³ en 10⁻⁶ bar H₂ (Deublein en Steinhäuser, 2008; Verstraete, 2008). Verhoogde waterstofconcentraties inhiberen dus de acetogenese door ongunstige thermodynamische omstandigheden. Daarom is een nauwe syntrofische relatie tussen methanogenen en de waterstofproducerende acetogenen essentieel. Door de methanogenese blijft de partiële waterstofgasdruk onder het inhiberende niveau voor de acetogenen. De "interspecies waterstof transfer" waarbij het waterstof rechtstreeks tussen de acetogenen en methanogenen wordt uitgewisseld, zorgt dat de reacties thermodynamisch gunstig verlopen (Batstone et al., 2006). Meer zelfs, een belangrijke oorzaak van onstabiliteit van anaerobe vergisting, is wanneer beide groepen van micro-organismen (zuurvormende en methanogenen bacteriën) uit balans geraken (Demirel en Yenigun, 2002).

Bij systemen onder stress kan er vanuit azijnzuur een anaerobe oxidatie gebeuren tot H₂ en CO₂, waardoor de acetogenese (reactie c uit Figuur 1) in beide richtingen doorgaat. De methanogenese verloopt dan enkel via de hydrogenotrofe weg. Gezien de verwijdering van H₂ essentieel is, is er ook hier sprake van een interspecies waterstof transfer (Schnürer et al., 1999).

1.3.6 Falende reactoren

Accumulatie van vrije vetzuren is een indicatie van stress in een anaerobe vergister. Andere aanwijzingen hiervoor zijn onder andere een lagere biogasproductie en het dalen van alkaliniteit en pH (Gerardi, 2003).

Naast de totale VVZ-concentratie kan gekeken worden naar de concentratie van enkele specifieke vetzuren. Hill et al. (1987) associeerden een concentratie van meer dan 0,8 g **azijnzuur** L⁻¹ met falen van de vergister. Een stijging in het azijnzuurniveau wijst op een probleem in de methanogene populatie, aangezien de omzetting naar methaan essentieel is om deze concentratie op een laag niveau te houden. Zeventig procent van het gevormde methaan is afkomstig van deze reactieweg, waardoor de totale productiviteit van de reactor in termen van methaanvorming gecorreleerd is met de azijnzuurconcentratie.

Een mogelijke indicatormolecule voor de acetogenese is **propionzuur**, want oxidatie van deze component levert de minste vrije energie op (Pind et al., 2003; Batstone et al., 2006). Propionzuuraccumulatie treedt op wanneer een reactor overladen wordt en is moeilijk te verwijderen. De maximum tolereerbare propionzuurconcentratie in reactoren varieert in functie van het soort afval en de gebruikte reactor. Inhibitie werd gerapporteerd in literatuur variërend van 0,8 g propionzuur L⁻¹ (Mosche en Jordening, 1998) tot 2,2 g propionzuur L⁻¹ (Barredo en Evison, 1991).

Andere onderzoeken wezen aan dat het eerder de **relatieve VVZ-concentraties** dan wel de absolute concentraties zijn die opgevolgd moeten worden. Ahring et al. (1995) vonden dat vooral de relatieve concentraties van VVZ, meerbepaald boterzuur en isoboterzuur, een doeltreffende indicatie gaven van de processtabiliteit van de vergister. Wanneer de verhouding propionzuur tot azijnzuur groter werd dan 1,4, wees dit eveneens op een falende reactor (Hill et al., 1987).

Biogasproductie laat toe om snel de reactortoestand te beoordelen (Boe et al., 2008). Naast de totale productie levert ook de samenstelling van het gas informatie. Een verhoging van de koolstofdioxideconcentratie in het biogas wijst op verstoringen van het anaerobe proces (Deublein en Steinhauser, 2008).

Tot slot geeft de **pH**-waarde een snelle indicatie van de stabiliteit van de reactor, aangezien de concentraties aan VVZ, koolstofdioxide en ammonium hier een invloed op hebben (Ripley et al., 1986). Een stijgende gasproductie wordt meestal vergezeld door een stijgende pH aangezien de methanogenese voor reductie van de VVZ zorgt (Kim et al., 2002). Kim et al. (2002) gebruikten een minimum van pH 5,5 om een gezonde reactor te kenmerken.

1.3.7 Microbiële analyses op anaerobe vergisters

Cultivatie-onafhankelijke moleculaire technieken zoals denaturerende gradiënt gel elektroforese (DGGE), sequentiebepaling van 16S ribosomaal ribonucleïnezuur (rRNA) en terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP), tonen aan dat de samenstelling van de microbiële gemeenschap een uiterst belangrijke factor is voor een goede reactorwerking. De link tussen veranderingen in de microbiële gemeenschap en verstoringen in de anaerobe vergisting is nog een groot vraagteken. McHugh et al. (2004) ondervonden dat granulaire instabiliteit en daling in de CZV verwijderingsefficiëntie in drie anaerobe hybride reactoren steeds voorafgegaan werden door veranderingen in de structuur van de microbiële gemeenschap. Biomonitoring van de microbiële samenstelling en dynamica zou daarom tot vroegtijdige herkenning van potentiële operationele problemen kunnen leiden, waardoor preventie of tijdig ingrijpen mogelijk is (McHugh et al., 2004; Talbot et al., 2008).

Tot nu is er weinig bekend over de reactie van microbiële gemeenschappen in biogasreactoren op veranderingen in voedingssamenstelling en operationele condities. Dit is deels door het gebrek aan geschikte methoden om de microbiële samenstelling op te volgen in de tijd.

Moleculaire technieken gebaseerd op nucleïnezuren zijn wijdverspreid in de vergelijkende microbiële ecologie om de diversiteit van een microbiële gemeenschap en de respons op veranderingen in de omgeving uit te drukken. De prokaryote 16S subeenheid van het ribosomaal RNA (16S rRNA) bleef sterk geconserveerd gedurende de evolutie, maar bevat ook variabele gebieden die het mogelijk maken om clusteranalyse uit te voeren en de sequenties te relateren aan de fylogenie (Talbot et al., 2008).

DGGE is in dit opzicht vaak gebruikt om een microbiële vingerafdruk te bekomen (Muyzer en Smalla, 1998; Talbot et al., 2008). Het resulterende profiel op polyacrylamidegel geeft de genetische structuur en diversiteit van een microbiële gemeenschap weer met een hoge toepasbaarheid, betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid (Muyzer en Smalla, 1998). De DGGE patronen kunnen zelfs gebruikt worden voor statistische analyses en berekeningen van biodiversiteit indices, zoals de Shannon-weaver index en clusteranalyses (Li et al., 2007). Elke gel geeft een gedetailleerde beschrijving van een bepaalde microbiële gemeenschap in relatie tot het bestudeerde milieu. Het was tot dusver echter niet eenvoudig om de resultaten van verschillende auteurs te vergelijken door verschillende experimentele opstellingen en een gebrek aan een algemeen aanvaarde manier van interpretatie van DGGE-gels.

Door Marzorati et al. (2008) werd een theoretische interpretatie van een DGGE-gel ontwikkeld die onafhankelijk is van de set-up. Dit is gebaseerd op drie analyseniveaus: (1) bereik-gewogen rijkheid R_r wat de capaciteit van het systeem weergeeft om species te kunnen onderhouden, (2) dynamiek van verandering D_y wat aanduidt hoe snel de microbiële gemeenschap evolueert en (3) functionele organisatie F_o wat gedefinieerd wordt door een relatie tussen de structuur van een microbiële gemeenschap en zijn functionaliteit. Deze R_r , D_y en F_o waarden kunnen in een 3D grafiek geplot worden om zo een visuele ecologische interpretatie te geven van het DGGE-patroon. Deze parameters reiken belangrijke informatie aan voor 'microbial resource management' of MRM (Verstraete et al., 2007). Naar analogie met human resource management wil men in het MRM-concept de capaciteiten van de microbiële gemeenschap ontdekken en ten volle benutten. Daarvoor dient in kaart gebracht te worden welke micro-organismen aanwezig zijn, welke groepen samenwerken en hoe ze gecontroleerd kunnen worden.

In de literatuur werden reeds enkele onderzoeken gerapporteerd met betrekking op analyses van de microbiële gemeenschap in anaerobe reactoren. Microbiële diversiteit is kleiner in reactoren werkzaam bij een hogere temperatuur (Levén et al., 2007). In een experiment van Rincón et al. (2008) werd er bij stijgende volumetrische belasting een hoger aantal fylotypes van Bacteria waargenomen onder de vorm van banden in de DGGE-analyse. De *Archaea* gemeenschap vertoonde een eerder statische samenstelling. Weiss et al. (2008) vergeleken DGGE patronen van *Bacteria* en *Archaea* in stalen van een thermofiele biogasinstallatie. Het patroon van de *Archaea* bestond uit opmerkelijk minder banden, wat wijst op een kleinere biodiversiteit. Dearman et al. (2006) vond een opmerkelijk stabiele *Archaea* gemeenschap ondanks veranderingen in de methaanproductie, wat suggereert dat de methaanvorming eerder door de activiteit van de *Archaea* species wordt beïnvloed dan door veranderingen in de gemeenschapsstructuur.

Daarnaast was er de bijzondere waarneming dat de structuur van de *Bacteria* significant gecorreleerd was met de snelheid van methaanvorming, wat niet het geval was voor de *Archaea* gemeenschap. Dit benadrukt het belang van de syntrofische relatie tussen de acetogene *Bacteria* en de methanogene *Archaea*. pH was significant gecorreleerd met zowel *Archaea* als *Bacteria*, wat bevestigt dat pH een belangrijke parameter is om de werking van anaerobe vergisters op te volgen. De *Bacteria* gemeenschapsstructuur was significant gecorreleerd met meerde typen vluchtige vetzuren (VVZ). Dit kan verklaard worden doordat VVZ gevormd worden door acidogene *Bacteria* en voedsel zijn voor acetogene *Bacteria*. Miura et al. (2007) toonden ten slotte aan dat voldoende dynamica in de microbiële gemeenschap of flexibiliteit om zich aan te passen aan veranderingen in het milieu, essentieel zijn voor een stabiele werking van anaerobe membraanbioreactoren.

1.4 Omgevingsfactoren

De snelheid en stabiliteit van het anaerobe afbraakproces zijn afhankelijk van een aantal omgevingsfactoren. De belangrijkste zijn: het soort substraat, aanwezigheid van nutriënten, temperatuur, pH en buffercapaciteit. Tevens geeft Aiyuk et al. (2006) een overzicht van de belangrijkste verhoudingen die een invloed hebben op de anaerobe vergisting, waarvan een samenvatting is weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Verhoudingen die de anaerobe vergisting beïnvloeden (Aiyuk et al., 2006)

Verhouding	Betekenis en/of richtwaarde
VSS:TSS*	Indicatie van bacteriële aangroei en verhoogde biodegradeerbaarheid
CZVs:VSS*	Geeft de aanrijking van snel beschikbare CZV in het substraat weer (Aiyuk et al., 2004)
C:N:P	Minstens 400:5:1 (Rajeshwari et al., 2000)
CZV:SO ₄	Minstens 10, anders treedt H ₂ S inhibitie op (Hulshoff Pol et al., 1998)

*VSS = vervluchtigbare stoffen in suspensie, TSS = totaal gehalte aan stoffen in suspensie, CZVs = chemische zuurstofvraag in oplossing

1.4.1 Substraat

Het gebruikte substraat bepaalt de snelheid van anaerobe vergisting, waarbij de voorkeur wordt gegeven aan makkelijk biodegradeerbaar materiaal. Hydrolyse is snelheidsbepalend in het geval van particulier materiaal, terwijl bij vloeibare afvalstromen de methanogenese de traagste stap is (Verstraete, 2008).

De biogasopbrengst is afhankelijk van de concentratie aan vluchtige stoffen, de compositie van het organisch materiaal en de biobeschikbaarheid. Tabel 2 toont de specifieke biogasopbrengst en methaanconcentratie per substraatcomponent.

Vetten leveren de hoogste biogasopbrengst, maar lange-keten vetzuren zijn moeilijk vergistbaar en kunnen tot inhibitie leiden. Korte-keten vetzuren en koolhydraten worden sneller omgezet, maar hebben een beduidend lagere biogasopbrengst (Nordberg, 2007).

Tabel 2: Specifieke biogasopbrengst en methaanconcentratie per substraatcomponent (Nordberg, 2007)

Substraatcomponent	Biogas opbrengst (L kg ⁻¹ VS)*	Methaanconcentratie (vol%)
Vetten	1000 - 1250	70 - 75
Proteïnen	600 - 700	68 - 73
Koolhydraten	700 - 800	50 - 55

* VS = vervluchtigbare stoffen

1.4.2 Aanwezigheid van nutriënten

De behoefte aan nutriënten is voor anaerobe vergisting laag in vergelijking met actief slibsystemen, door het feit dat er bij vergisting weinig biomassa ontwikkeld wordt. Een CZV:N:P-verhouding van 300:5:1 staat garant voor een snelle opstart (Aiyuk et al., 2004) en een verhouding 800:5:1 is voldoende om de methaanvorming te onderhouden (Deublein en Steinhauser, 2008).

Nutritionele tekorten kunnen leiden tot een onvolledige en onstabiele bioconversie van de organische substraten. Zelfs als het substraat heterogeen is, zoals bijvoorbeeld keukenafval, bevordert het toevoegen van nutriënten de vergisting (Kim et al., 2002). De optimale concentraties zijn tot nu toe enkel experimenteel te bepalen. Chemische supplementen zijn een mogelijkheid, maar covergisting is een efficiëntere oplossing (Kayhanian en Rich, 1995).

1.4.3 Temperatuur

In de anaerobe vergisting worden drie klassen onderscheiden afhankelijk van het temperatuursbereik. Psychrofiële reactoren opereren tussen 5 en 15 °C. Mesofiele reactoren werken bij een temperatuur tussen 32 en 42 °C en thermofiele vergisting gebeurt bij 48 tot 55 °C (Rajeshwari et al., 2000; Deublein en Steinhauser, 2008).

Thermofiele reactoren bieden voordelen ten opzichte van mesofiele reactoren in de zin van een hogere reactiesnelheid, betere afbraak van pathogenen, hogere organische volumetrische belasting (OVV), betere ontwatering van het slib en stabielere afval (Lo et al., 1985; Han et al., 1997; Watanabe et al., 1997; Kuo en Cheng, 2007). Bij thermofiele reactoren kan eenzelfde efficiëntie bekomen worden met een kortere hydraulische verblijftijd in vergelijking met mesofiele reactoren. Ze hebben een hogere behandelingscapaciteit, waardoor reductie van het reactorvolume mogelijk is (Kuo en Cheng, 2007). Tot slot is de slibproductie kleiner doordat thermofiele bacteriën een lagere groeiopbrengst hebben (Kim et al., 2002). Een mogelijke verklaring hiervoor is de hogere energiebehoefte voor onderhoud bij thermofiele temperaturen (Zeikus, 1979).

Nadelig aan thermofiele reactoren is dat er meer energie nodig is om de hoge temperatuur te behouden. Bovendien zijn ze minder stabiel dus moeilijker om te controleren en gebeurt de opstart trager. Tot slot is de kwaliteit van het effluent meestal lager (Pfeffer, 1974; Buhr en Andrews, 1977; Pavlostathis en Giraldogomez, 1990; Appels et al., 2008).

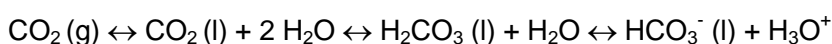
Methanogene bacteriën zijn zeer gevoelig aan snelle temperatuursveranderingen, thermofiele methanogenen nog meer dan mesofiele methanogenen. Kleine verschillen in temperatuur kunnen al een activiteitsverlies veroorzaken. Het is dus belangrijk om de temperatuur binnen een bereik $\pm 2^\circ\text{C}$ te houden (Deublein en Steinhauser, 2008).

1.4.4 pH

De vergisting is in grote mate pH-afhankelijk. Het optimale pH-bereik voor de methaanproducerende bacteriën is 6,7 tot 8,0, terwijl voor zuurvormende bacteriën een zuurdere pH wenselijk is (Deublein en Steinhauser, 2008; Speece, 2008). De pH van anaerobe systemen wordt typisch binnen de methanogene limieten gehouden om dominantie van de zuurvormende bacteriën te voorkomen, wat zou leiden tot vetzuuraccumulatie (Rajeshwari et al., 2000). pH controle door toevoegen van chemicaliën kan nodig zijn bij het behandelen van sommige industriële afvalstromen. Voor de meeste types afvalwater zoals bijvoorbeeld huishoudelijk afvalwater is de samenstelling zonder aanpassing al in het optimale pH-bereik (Van Haandel en Lettinga, 1994).

1.4.5 Buffercapaciteit

Het is essentieel dat de reactorinhoud voldoende buffercapaciteit heeft om een eventuele vetzuuraccumulatie te neutraliseren en zo de opbouw van lokale zure zones in de reactor te voorkomen (Rajeshwari et al., 2000). Een te sterke verzuring wordt voorkomen door het $\text{CO}_2/\text{HCO}_2^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ -buffersysteem.



Tijdens de fermentatie wordt het geproduceerde CO_2 grotendeels in de gasfase vrijgesteld. Bij dalende pH waarden zal het reactie-evenwicht van bovenstaande reacties meer naar links verschuiven. Bij stijgende pH wordt er meer bicarbonaat gevormd waarbij waterstofionen worden vrijgesteld (Deublein en Steinhauser, 2008). Wanneer de CO_2 concentratie in het biogas toeneemt, is dit een indicatie van een verstoorde vergisting.

De verhouding tussen totale vrije vetzuren en alkaliniteit geeft een indicatie van de processtabiliteit aangezien dit enerzijds afhankelijk is van voldoende buffercapaciteit en anderzijds van het vermijden van overdadige VVZ concentraties. In de praktijk kan deze verhouding benaderd worden door middel van de Ripley-index. Deze dimensieloze verhouding wordt bekomen door een eenvoudige titratie waarna de intermediaire alkaliniteit gedeeld wordt door de totale alkaliniteit. Bij een Ripley-index van maximaal 0,3 spreekt men van een goede anaerobe vergisting zonder verzuringsrisico (Ripley et al., 1986). Vaak wordt natriumbicarbonaat (NaHCO_3) toegevoegd om voldoende alkaliniteit te voorzien (Rajeshwari et al., 2000).

1.5 Reactortypes

1.5.1 Eerste generatie: Continuous stirred tank reactor

Een mechanisch mengsysteem verzekert goed contact tussen biomassa en het organische materiaal in een continuous stirred tank reactor (CSTR). Deze eerste generatie reactoren zijn eenvoudig in bedrijfsvoering, maar de kwaliteit van het effluent is laag in vergelijking met nieuwere typen anaerobe vergisters. Dit is te verklaren door het feit dat er "kortsluiting" van de voeding kan optreden, waarbij een deel van de voeding een kortere verblijftijd heeft dan de gemiddelde verblijftijd in de reactor (Azbar et al., 2001). Een CSTR is geschikt om afval te verwerken met een hoge concentratie aan opgeloste organische stoffen of vaste stoffen (2 g L^{-1} en hoger). De belangrijkste nadelen zijn de input van mengenergie en de grote reactorvolumes teneinde een voldoende lange hydraulische verblijftijd te garanderen van ongeveer 20 dagen (Verstraete, 2008).

1.5.2 Tweede generatie: Upflow anaerobic sludge blanket

In de tweede generatie anaerobe reactoren is er minder uitspoeling van biomassa. In een upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor zijn bacteriën geaggregeerd tot granules met een hoge bezinkbaarheid en bioactiviteit. Bovendien vormt elke granule een ecosysteem wat de syntrofische associatie vergemakkelijkt tussen waterstofproducerende acetogenen en waterstofverbruikende methanogenen (Fang et al., 1994).

Het anaerobe slib in een UASB reactor heeft goede bezinkingseigenschappen en wordt gemengd door de opwaartse stuwning van inkomend afvalwater en gasbellen geproduceerd in de reactor. De opwaartse stroomsnelheid varieert van één tot twee meter per uur, wat mechanisch mengen overbodig maakt. Investerings-, onderhouds- en werkingskosten zijn daardoor significant lager. De natuurlijke menging zorgt eveneens voor goede granulatie-eigenschappen van het slib (Lettinga, 1995). Een eenvoudige vaste stof - vloeistof - gas afscheiding is geïmplementeerd in de reactor.

Een kortere verblijftijd, kleiner reactorvolume en betere prestatie door hoge biomassaconcentratie zijn de belangrijkste voordelen van dit reactortype. De UASB-reactor wordt daarom vaak gebruikt bij hoge influentstromen. Bij relatief laag belaste afvalwaters zoals huishoudelijk afvalwater, is het niet de organische volumetrische belasting maar eerder de hydraulische verblijftijd die de vorm en grootte van de UASB-reactor bepaalt. Verscheidene studies in laboratoria en op industriële schaal hebben aangetoond dat het UASB-concept betrouwbaar en eenvoudig toe te passen is voor de behandeling van huishoudelijk afvalwater, maar ondanks deze bevinding wordt het tot nu toe zelden hiervoor ingezet (Van Haandel en Lettinga, 1994). Een groot nadeel is immers dat het UASB-effluent een hoge concentratie aan fecale micro-organismen bevat. Een aerobe nabehandeling is onontbeerlijk om te voldoen aan de effluentnormen van de World Health Organization (WHO, 1989) voor ongelimiteerde irrigatie. Daarnaast is de kans op verstopping reëel, kunnen er preferentiële wegen in het slibbed ontstaan en is dit reactortype niet geschikt voor afvalstromen met een hoog gehalte aan vaste stoffen.

1.5.3 Derde generatie: Expanded granular sludge bed

Als variant op het UASB-proces is de expanded granular sludge bed (EGSB) reactor ontwikkeld met een geoptimaliseerde fasescheiding en hogere opwaartse stroomsnelheid van 6 tot 15 meter per uur waardoor fluidisatie van het slibbed optreedt. Door de hogere kinetische energie van het influent is intensiever contact tussen het slib en het inkomende organische materiaal verzekerd. EGSB-reactoren zijn te verkiezen voor afvalwaters met een CZV concentratie van minder dan 1 g L^{-1} of wanneer bij lage temperaturen gewerkt wordt. Bijkomend voordeel is dat klein, inactief materiaal verwijderd wordt. Nadelen zijn de hogere kosten die bouw en opvolging vergen en bovendien hebben partikels de neiging om uitgewassen te worden uit het slibbed (Zoutberg en de Been, 1997; Verstraete, 2008).

1.5.4 Vierde generatie: Interne circulatie

Opwaartse stroomsnelheden in een reactor met interne circulatie (IC) kunnen oplopen tot 20 à 30 meter per uur. Twee conventionele gasafscheiders zijn ingebouwd, waarvan één halfweg de hoogte van de reactor is geplaatst. Dankzij goede menging en een hoge schuifspanning op de granules, wordt de uitwas van de fermentatieve bacteriën gecontroleerd. De vergisting vindt sneller en efficiënter plaats en er is een hogere biogasproductie (Pereboom en Vereijken, 1994; Verstraete, 2008).

1.5.5 Sequentiële Batch Reactor

Een anaerobe sequentiële batch reactor (SBR) werkt in vier stappen. In de eerste fase wordt de reactor gevoed en de tweede fase is de reactiestap waarbij biomassa het organische materiaal afbreekt. Beluchting gebeurt continu of met intervallen. Als derde fase wordt de menging stilgelegd zodat het slib kan bezinken. Dit verkleint het biomassaverlies wanneer het effluent wordt gedecanteerd in de laatste stap. Het biomassaverlies is dus afhankelijk van de sedimentatiestap, waarvan de effectiviteit op zijn beurt afhangt van de bezinkingskarakteristieken van het slib (Sung en Dague, 1995).

De SBR bedrijfsvoering resulteert in afwisselend hoge en lage substraatconcentraties ("feast/famine"). De hoge substraatconcentratie vlak na het voeden veroorzaakt hoge conversie van substraat naar biogas. De lage substraatconcentratie tegen het einde van de reactiecyclus zorgt voor efficiënte bioflocculatie en bezinking (Dague et al., 1992).

Dit type van reactor heeft verschillende voordelen ten opzichte van continue reactorconfiguraties: er is geen "kortsluiting" van vloeistof en er is geen influentdistributiesysteem op de bodem nodig (Dague et al., 1992; Sung en Dague, 1995). Sequentiële batch reactoren zijn geschikt om industriële en stedelijke afvalwaters met een lage belasting te behandelen, zelfs bij lage temperatuur, en dit met een lagere kost dan de conventionele aerobe systemen (Ratusznei et al., 2000).

1.5.6 Twee-fasen systeem

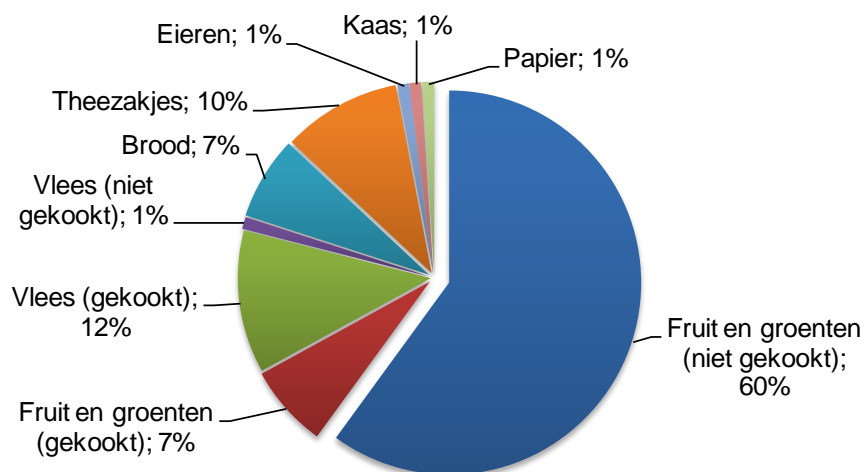
Het twee-fasen systeem heeft een hogere efficiëntie en is beter bestand tegen shocken van organische belasting dan een conventioneel één-fase systeem (Bull et al., 1984). Een korte acidogene fase wordt gevolgd door een langere methanogene fase, meestal met een scheiding tussen beide reactoren om particulier materiaal in de acidogene fase te weerhouden (Demirel en Yenigun, 2002). De scheidingsmethoden zijn echter duur en bovendien is de werking en controle van een twee-fasen systeem gecompliceerder. De effluentkarakteristieken van de acidogene reactor (pH, VVZ, nutriënten) moeten immers vaak aangepast worden alvorens het effluent gevoed kan worden aan de methanogene reactor (Babel et al., 2004). Hoewel biodegradeerbaarheid van moeilijk afbreekbare materialen verbeterd kan worden in een twee-fasen systeem, is de syntrofische relatie tussen acetogenen en methanogenen vaak verstoord, waardoor productinhibitie kan optreden in de acidogene reactor. Azijnzuur kan bijvoorbeeld propionzuurafbraak tegengaan of hoge partiële waterstofgasdruk kan leiden tot accumulatie van VVZ (Furumai, 1997).

1.6 Anaerobe vergisting van keukenafval

In Europa wordt er ongeveer 100 Mton keukenafval per jaar geproduceerd wat 40 % van het huishoudelijk afval is (Adhikari et al., 2006). Keukenafval bevat een hoog organisch gehalte en een hoge concentratie makkelijk biodegradeerbaar materiaal, wat het een interessant substraat voor anaerobe vergisting maakt. Het levert 440 L gas kg^{-1} op met een methaaninhoud van 65% (Nordberg, 2007). Het hoge vochtgehalte vereist echter veel energie bij verbranding en het hoge zoutgehalte kan dioxineverspreiding met zich meebrengen. Bovendien zijn de investeringskosten voor verbranding hoog. Bij het storten van het afval zijn de investeringskosten laag, maar is er een grote bijdrage aan het broeikaseffect door de uitstoot van methaan. Daarnaast neemt deze methode een groot oppervlak in beslag, zijn er geurproblemen en moet het percolatiewater gezuiverd worden. Compostering neemt een geruime tijd in beslag en geeft eveneens geurproblemen (Deublein en Steinhauser, 2008). Anaerobe vergisting is daarom in vele gevallen een beter alternatief voor de verwerking van keukenafval.

Keukenafval is geen makkelijk substraat voor anaerobe vergisting. Het dient achtereenvolgens verkleind, gehomogeniseerd en verdund te worden om de concentratie aan organisch materiaal te verkleinen en om de reactoren bij een optimale OVB te kunnen voeden. In het algemeen hebben continue systemen met één fase een maximale OVB van ongeveer $4 \text{ g VS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Voor keukenafval is deze waarde strikter gelimiteerd (Liu et al., 2007). Door een grote vetzuurproductie daalt de pH snel en worden de methanogene bacteriën onder stress gebracht. Verschillende experimenten werden beschreven met keukenafval of een analoog als substraat, waarbij steeds aangehaald werd dat dit soort afval een grote en snelle VVZ productie heeft waardoor het niet mogelijk is om een hoge OVB te bereiken. In het onderzoek van Hecht en Griehl (2009) was $2,6 \text{ g VS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de maximale OVB bij een hydraulische verblijftijd (HRT) van 40 dagen. Bouallagui et al. (2005) rapporteerden de beste resultaten bij een HRT van 20 dagen eveneens bij een OVB van $2,6 \text{ g VS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

De universiteit van Southampton heeft in 2002 een studie uitgevoerd ter evaluatie van mesofiele en thermofiele vergisting met het oog op stabilisatie en verwerking van keukenafval (Banks, 2003). Keukenafval werd opgehaald bij een honderdtal huishoudens die hun afval gescheiden verzamelden. De samenstelling van het keukenafval is weergegeven in Figuur 2. De anaerobe vergisters werden gevoed met gemixt keukenafval dat verdund werd tot de gewenste OVB. De verdunning gebeurde met water of met gerecirculeerd digestaat. De mesofiele vergister werd opgestart met een hydraulische verblijftijd van 31,5 dagen met een volumetrische belasting van $4,1 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. De HRT werd geleidelijk verminderd tot 20 dagen waarbij de volumetrische belasting $5,72 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ was, maar deze te hoge belasting leidde tot falen van de reactor door VVZ accumulatie en pH daling. De thermofiele reactor faalde bij een belasting van $5,46 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. De thermofiele reactor kon niet dezelfde belasting bereiken als de mesofiele reactor, waarbij accumulatie van inhiberende stoffen werd aangehaald als meest waarschijnlijke oorzaak.



Figuur 2: Gemiddelde samenstelling van keukenafval uitgedrukt in gewichtspercentages (Banks, 2003)

Desintegratie van de celstructuur bevordert de anaerobe vergisting door een betere afbraak van het substraat, hogere biogasopbrengst en lagere slibviscositeit (Deublein en Steinhauser, 2008). Door deze effecten kan voorbehandeling van keukenafval zorgen voor een stabielere en betere werking (Kuo en Cheng, 2007).

Hoofdstuk 2 Inhibitie

Paracelsus ontdekte reeds in de 15^e eeuw dat enkel de dosis bepaalt of een substantie al dan niet giftig is. Elke stof is inhiberend of zelfs toxisch boven een bepaalde concentratie (Vanvelsen, 1979). Hierbij dient opgemerkt te worden dat enkel opgeloste stoffen toxisch kunnen zijn voor biologisch leven (McCarty, 1964). Daarnaast zijn methanogene bacteriën bijzonder gevoelig voor bepaalde omgevingsfactoren zoals pH en temperatuur wat beschreven werd in paragraaf 1.4. Tot slot kunnen zelfs kleine hoeveelheden zuurstof of oxiderende stoffen zoals nitraat de methanogenen inhiberen aangezien het obligate anaeroben zijn (Deublein en Steinhauser, 2008).

Het merendeel van de omgevingsfactoren die de reactorprestatie beïnvloeden, zijn gelinkt met de voedingssamenstelling, meer bepaald de aanwezigheid van inhiberende of toxische componenten en intermediaire producten. Enkele belangrijke factoren zijn: ammonium, natrium, sulfide, oliën en vetten, korte-keten vetzuren en zware metalen (Vanvelsen, 1979).

Micro-organismen hebben meestal de capaciteit om zich in zekere mate aan te passen aan inhiberende concentraties. Door de lage groeisnelheid van methanogene bacteriën, neemt de acclimatisatie echter aanzienlijke tijd in beslag.

2.1 Ammonium/ammoniak

Totale ammoniakale stikstof (TAN) in waterige oplossingen bestaat uit twee vormen: het ammonium-ion (NH_4^+) en het niet-geïoniseerde ammoniak (NH_3). Ze worden geproduceerd bij de anaerobe afbraak van organische stikstofcomponenten zoals aminozuren en proteïnen (Kayhanian, 1999; Chen et al., 2008). Ammonium wordt door de bacteriën in de anaerobe vergister gebruikt als stikstofbron. Opgelost ammoniakgas is toxisch voor de bacteriën, vooral voor de methaanvormende bacteriën (Kayhanian, 1994; Gerardi, 2003). NH_3 is ongeladen en hydrofoob, waardoor het biologische membranen makkelijker kan penetreren dan het geladen en gehydrateerde NH_4^+ -ion (Downing en Merkens, 1955; de Baere et al., 1984). Er worden verschillende mechanismen geopperd voor de ammoniakinhibitie, zoals verandering in de intracellulaire pH, verhoging van de energiebehoefte voor onderhoud en inhibitie van een specifieke enzymreactie (Whittmann et al., 1995).

Beide vormen, ammoniak en ammonium, zijn in evenwicht en hun relatieve concentraties zijn pH- en temperatuursafhankelijk. De bacteriën zijn meer sensitief voor totale ammoniakale concentraties bij hoge pH en hoge temperatuur. Het evenwicht $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{NH}_3$ ligt in die omstandigheden immers meer naar rechts (Omil et al., 1995). Onder mesofiele omstandigheden is er minder ammoniuminhibitie dan in thermofiele reactoren, omdat er over het algemeen een lagere concentratie aan inhiberend vrij ammoniak aanwezig is (Deublein en Steinhauser, 2008).

De algemene formule om het NH₃ percentage te berekenen, wordt gegeven door volgende vergelijking:

$$\text{Niet-geïoniseerd NH}_3 (\%) = \frac{100}{1+10^{(\text{pK}_a-\text{pH})}}$$

De dissociatieconstante voor ammonium (pK_a) kan berekend worden met volgende formule:

$$\text{pK}_a = \frac{0,09018 + 2729,92}{273,2 + T (\text{°C})} \quad (\text{Emerson et al., 1975})$$

In de literatuur circuleren er heel uiteenlopende standaarden voor inhiberende ammoniakconcentraties. Tegenstellingen in deze waarden zijn te verklaren doordat ze bekomen zijn onder verschillende condities zoals pH, temperatuur en inoculum (Angelidaki en Ahring, 1993). Inhibitiestudies die enkel TAN-concentraties vermelden zijn zelfs misleidend, aangezien eenzelfde TAN-concentratie kan overeenstemmen met zeer uiteenlopende vrije ammoniakconcentraties door verschillen in temperatuur en pH (Kayhanian, 1999).

Gerardi (2003) beschreef de effecten van verschillende TAN concentraties (Tabel 3).

Tabel 3: Effect van TAN bij verschillende concentraties (Gerardi, 2003)

Totale ammoniakale stikstof (TAN)	Effect
50-200 mg L ⁻¹	Bevorderend
200-1000 mg L ⁻¹	Geen ongunstig effect
1500-3000 mg L ⁻¹	Inhiberend als pH > 7

Methanogenese kan doorgaan bij hoge ammoniakconcentraties na een initiële adaptatieperiode of bij gebruik van inoculum dat reeds aangepast was aan hoge ammoniakconcentraties. Dit resulteert echter in een tragere methanogenese of een verlaging van de methaanopbrengst (Angelidaki en Ahring, 1993). Procesinstabiliteit door ammoniak resulteert in accumulatie van vrije vetzuren, wat op zijn buurt kan leiden tot een verlaging van de pH en daardoor verlaging van de concentratie aan vrij ammoniak in de reactor. Dit verklaart waarom het anaerobe vergistingsproces zelfs bij hoge ammoniakconcentratie kan stabiliseren, maar met een lagere methaanopbrengst, de zogenaamde “geïnhibeerde steady state” (Angelidaki en Ahring, 1993).

Efficiënte anaerobe vergisting kan enkel verzekerd worden als de ammoniakconcentratie in de reactor onder de inhiberende concentratie wordt gehouden. Enkele praktische oplossingen hiervoor zijn het aanpassen van de pH in de reactor, verdunnen van de reactorinhoud met vers water of controle van de C:N verhouding (Kayhanian, 1999). Twee fysisch-chemische methoden om ammoniak te verwijderen uit het substraat dat gevoed wordt, zijn strippen en chemische precipitatie. Beiden zijn technisch haalbaar bij hoge ammoniakconcentratie en in complexe afvalwaters (Kabdasli et al., 1999).

2.2 Natrium

In lage concentraties is natrium essentieel voor methanogene bacteriën, waarschijnlijk door de rol die het speelt bij de vorming van adenosinetriphosfaat (ATP) of bij de oxidatie van nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Dimroth en Thomer, 1989; Dybas en Konisky, 1992). De optimale concentratie voor methanogenese is sterk afhankelijk van de oorsprong van het slib en varieert van 0,23 g L⁻¹ bij culturen opgegroeid in een medium met laag zoutgehalte tot 12 g L⁻¹ bij culturen opgegroeid in een marien medium (Rinzema et al., 1988; Sowers en Gunsalus, 1988).

Natriumconcentraties die 50% inhibitie van de gasproductie veroorzaken variëren van 3 tot 16 g L⁻¹. Volledige inhibitie treedt op bij 30 g L⁻¹ (Feijoo et al., 1995; Kuo en Cheng, 2007). Natriumtoxiciteit bij anaerobe vergisting is afkomstig van natriumzouten in de aangeleverde substraten (vooral uit de voedingsindustrie) en van het gebruik van NaOH en Na₂CO₃ voor pH- en alkaliniteitscontrole. De acetoclastische methanogenen zijn meer gevoelig aan natrium dan de waterstofverbruikende bacteriën (Feijoo et al., 1995; Bashir en Matin, 2004). Slib dat vroeger al in contact is geweest met hoge natriumconcentraties vertoont een hogere tolerantie ten opzichte van natrium. Dit is het gevolg van adaptatie van de methanogene bacteriën (Chen et al., 2003).

De anaerobe micro-organismen kunnen een hogere natriumconcentratie tolereren in aanwezigheid van andere kationen en anionen in het medium, zoals Cl⁻, SO₄²⁻ en Mg²⁺. De concentraties kunnen 4 tot 10 g L⁻¹ hoger zijn voordat er 50% inhibitie optreedt (Feijoo et al., 1995). Dit fenomeen wordt aangeduid met de term antagonisme. Natrium in zeewaterige milieus veroorzaakt daarom een lagere inhibitie dan eenzelfde concentratie in een NaCl of Na₂SO₄ oplossing. In dit opzicht is bijvoorbeeld magnesium zeer effectief om de natriumtoxiciteit te reduceren, de optimale magnesiumconcentratie hiervoor was 0,55 g L⁻¹ bij een natriumconcentratie van 9 g L⁻¹ in mesofiele CSTR reactoren (Bashir en Matin, 2004).

2.3 Sulfide

Inhibitie door sulfide speelt zich af op twee verschillende niveaus. De primaire inhibitie wordt veroorzaakt door competitie voor substraat tussen acetogene en methanogene micro-organismen enerzijds en sulfaat reducerende bacteriën (SRB) anderzijds. De secundaire inhibitie is afkomstig van de toxiciteit van sulfide voor verschillende micro-organismen die werkzaam zijn in het vergistingsproces (Chen et al., 2008).

De aanwezigheid van sulfaat zorgt voor een alternatieve elektronacceptor naast CO₂. De SRB wenden H₂ aan met de vorming van H₂S, waardoor er minder H₂ beschikbaar is voor de methanogenese (Hulshoff Pol et al., 1998; Appels et al., 2008).

Het toxische effect van sulfide wordt veroorzaakt door het niet-gedissocieerde waterstofsulfide H₂S, aangezien enkel neutrale moleculen door het celmembraan kunnen migreren. De graad van dissociatie is afhankelijk van de pH en inhibitie van methanogene en acetogene bacteriën is eveneens in functie van het type van organisch substraat en de CZV:S (Hulshoff Pol et al., 1998; Chen et al., 2008). Dit verklaart waarom er uiteenlopende waarden voor inhiberende H₂S concentraties circuleren in de literatuur. Globaal gezien treedt 50% inhibitie van de

methaanproducerende bacteriën op rond 100 tot 300 mg S L⁻¹ (Appels et al., 2008; Chen et al., 2008).

Sulfide en waterstofsulfide veroorzaken allerlei problemen bij de anaerobe vergisting. Ze zorgen zoals eerder reeds vermeld voor inhibitie van acetogene en methanogene bacteriën, maar daarnaast zijn deze stoffen verantwoordelijk voor geuremissies, corrosie van beton en staal en SO₂-emissies bij biogasverbranding (Khanal en Huang, 2003). Een voordeel van een gematigde sulfideconcentratie is de verwijdering van zware metalen uit de oplossing door precipitatie (Hulshoff Pol et al., 1998).

Desulfurisatie is mogelijk door middel van (fysico-)chemische en biologische methoden (Chen et al., 2008), maar een zeer goed alternatief is het toedienen van beperkte hoeveelheden zuurstof in de anaerobe reactor. Meerdere onderzoeken toonden aan dat dit een efficiënte, eenvoudige en relatief goedkope techniek is om de sulfideconcentratie in de vloeibare fase en het biogas te verlagen (Krishnakumar et al., 2005; van der Zee et al., 2007).

2.4 Overige inhibitoren

Olie en vetten inhiberen de biologische reacties, omdat ze gehydrolyseerd worden tot glycerol en verder tot lange-keten vetzuren (LCFA, Long chain fatty acids) (Hanaki et al., 1981). Deze LCFA's absorberen biomassa en vertragen het transport van het substraat. Voor thermofiele anaerobe vergisting treedt inhibitie op vanaf 1 g L⁻¹ (Kuo en Cheng, 2007).

Belangrijke intermediaire producten in de anaerobe vergisting zijn de **korte keten vetzuren**. Een overmaat VVZ kan echter toxisch zijn voor de micro-organismen, in het bijzonder voor de methanogenen (Pind et al., 2003). Verhoogde concentraties ontstaan door ongebalanceerde reacties in het anaerobe proces als gevolg van variatie in bijvoorbeeld temperatuur, organische belasting of toxische componenten in het influent (Ahring et al., 1995; Nielsen et al., 2007). De toxiciteit van VVZ wordt voornamelijk veroorzaakt door hun ongedissocieerde vorm die vrij door het celmembraan van de bacteriën kan getransporteerd worden. Als het vetzuur dissocieert in de bacteriële cel, heeft dit tot gevolg dat de pH daalt waardoor de homeostase verstoord wordt (Boe et al., 2008).

Enzymen en co-enzymen hebben vaak een minimale hoeveelheid van bepaalde **metalen** nodig voor hun activatie en activiteit. In grote hoeveelheden zijn zware metalen zoals Pb, Cu en Cd echter toxisch voor micro-organismen (Osuna et al., 2003; Chen et al., 2008). Verwijdering van zware metalen uit de oplossing kan in aanwezigheid van sulfiden gebeuren door precipitatie zoals reeds vermeld werd (Hulshoff Pol et al., 1998).

Hoofdstuk 3 Optimalisatietechnieken

3.1 Macro- en micronutriënten

De aanwezigheid van macronutriënten zoals stikstof, fosfor, kalium en magnesium en micronutriënten zoals nikkel, kobalt en zink, is belangrijk bij het anaerobe behandelingsproces. Macro- en micronutriënten dragen bij tot de productie en verwijdering van vluchtige vetzuren aangezien de groei van methanogene conglomeraten sterk afhankelijk is van dergelijke omgevingsfactoren (Cresson et al., 2006).

Macro- en micronutriënten zijn essentieel voor de groei van anaerobe micro-organismen doordat ze betrokken zijn bij enzymatische reacties van de acidogenese en bij het stimuleren van biochemische cofactoren voor methaanproductie. Een gebrek aan sporenelementen leidt tot onvolledige VVZ afbraak, wat resulteert in een slecht functionerende anaerobe vergister (Kim et al., 2002; Osuna et al., 2003). Beperkte hoeveelheden van deze nutriënten stimuleren de groei van micro-organismen, terwijl zeer hoge concentraties toxische effecten hebben. De grens tussen stimulerende en toxische concentraties is vaag en bovendien afhankelijk van het type van substraat (Soto et al., 1993; Chen et al., 2008).

Recent werd het effect van macro- en micronutriënten toevoeging aangetoond in UASB-reactoren gevoed met propionzuur (Ma et al., 2009). Macronutriënten verbeterden de effluentkwaliteit door een halvering van de oplosbare CZV en propionzuurconcentraties. Daarnaast werd een verdubbeling van de biogasproductie waargenomen. Op het ogenblik dat de macronutriënten dosering werd stopgezet, verslechterde de werking van de reactoren in eenzelfde mate (50% hogere CZVs en propionzuurconcentraties in het effluent). Bij toevoeging van micronutriënten bleef de effluentkwaliteit ongewijzigd, maar de biogasproductie nam met 10% toe. Micronutriënten maakten het bovendien mogelijk om een hogere OVB te verwerken in de reactoren (Ma et al., 2009). Het positieve effect van micronutriënten werd eveneens waargenomen door Climenhaga en Banks (2008) die het belang van de toevoeging benadrukten voor stabiele vergisting bij hoge VVZ niveaus. Zitomer et al. (2008) toonden ten slotte aan dat de snelheid van propionzuurafbraak bevorderd werd door micronutriënten.

In batch reactoren die dagelijks gevoed werden met mest van koeien en gevogelte, werd het effect van ijzersulfaat onderzocht door Rao en Seenayya (1994). Toevoeging van 50 mM ijzersulfaat in de reactoren had een snellere conversie van het substraat tot gevolg wanneer de voeding werd gestopt. Overladen reactoren stabiliseerden binnen 48 uur. Door 20 mM ijzersulfaat toe te voegen aan de dagelijks gevoede batch reactoren, steeg de methanogenese met 40% en steeg de conversiesnelheid van vaste en vluchtige stoffen en vrije vetzuren (Rao en Seenayya, 1994).

3.2 Micro-aeratie

Micro-aeratie kan de productie van H_2S onderdrukken zonder de efficiëntie van de vergister of de methanogene activiteit te beïnvloeden, wat zowel op laboschaal als op industriële schaal werd aangetoond (Khanal en Huang, 2003; Tang et al., 2004; Jenicek et al., 2007). Het werkingsmechanisme van dit effect is nog niet ontleed. Tang et al. (2004) konden door middel van moleculaire biologische technieken aantonen dat micro-aeratie geen verschillen in de microbiële diversiteit teweeg brengt. Bovendien werd de activiteit van de sulfaat reducerende bacteriën niet onderdrukt, ondanks het feit dat de concentratie aan waterstofsulfide zeer laag was in het biogas. Nadelig aan de gecontroleerde zuurstofdosing is de hogere CZV oxidatie gekoppeld met een lagere methaanproductie, een hogere stikstofconcentratie in het biogas en veranderingen in de specifieke activiteit van de anaerobe biomassa (Krishnakumar et al., 2005; van der Zee et al., 2007).

3.3 Polyurethaanschuim

Door de trage groei van anaerobe bacteriën is het voorkomen van uitwassen van biomassa een belangrijke strategie voor het optimaliseren van de anaerobe vergisting (Speece, 2008). Dit kan bewerkstelligd worden door enerzijds het slib te laten bezinken alvorens het effluent te onttrekken, zoals in een SBR bijvoorbeeld wordt toegepast (Sung en Dague, 1995) of anderzijds door een bepaald dragermateriaal te implementeren in de reactor. Dragermateriaal beïnvloedt de biomassaretentie in de reactor, waardoor de slibverblijftijd in de reactor verhoogt. De hydraulische verblijftijd kan ingekort worden zonder gevaar voor uitwassen van de biomassa (Silva et al., 2006). Bovendien kan dragermateriaal een bijdrage leveren tot de vorming van een hechte microbiële gemeenschap doordat de micro-organismen zich in een vaste structuur ten opzichte van elkaar kunnen positioneren. Een goede samenwerking binnen de microbiële gemeenschap is essentieel voor een goede reactorwerking (Kim et al., 2002).

Het gebruik van inert dragermateriaal om cellen te immobiliseren in sequentiële batchreactoren is een veelbelovende techniek om de biomassaretentie te verbeteren. Doordat het de bezinkingsstap overbodig maakt, wordt de totale cyclus verkort. Bovendien worden onzekerheden over slibgranulatie geëlimineerd door immobilisatie van de biomassa (Ratusznei et al., 2000; Garcia et al., 2008). Sarti et al. (2007) gebruikten stukjes polyurethaanschuim (kubussen met zijden van 5 cm) met een dichtheid van 23 kg m^{-3} en een porositeit van 40% in een SBR van 1 m^3 . Het polyurethaan werd in een geperforeerde stalen korf vastgehouden aan de zijanten van de reactor.

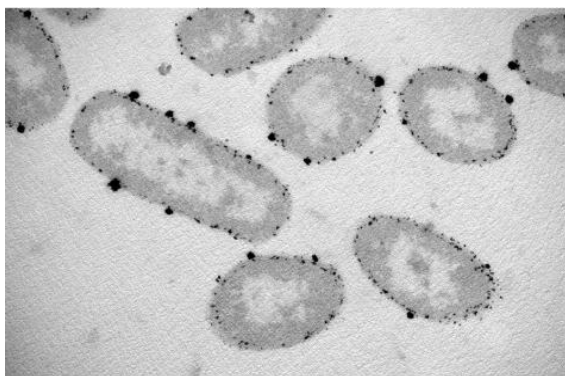
De keuze van het dragermateriaal blijkt een bepalende factor voor de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de reactor. Verschillende dragers kunnen op die manier gebruikt worden voor specifieke toepassingen. Bij het vergelijken van verschillende dragermaterialen zoals polyurethaanschuim, lage-dichtheid polyethyleen en aluminiumgebaseerde keramiek, vertoonde polyurethaan de hoogste specifieke biomassaconcentratie (Silva et al., 2006).

Onderzoek van Yang et al. (2004) toonde eveneens aan dat de karakteristieken van het gebruikte dragermateriaal een invloed hebben op de methaanvorming. De poreuze structuur van polyurethaan gaf een beter resultaat dan de vezelachtige structuur van steenwol in termen van biogasproductie.

De productie van extracellulaire polymeren door micro-organismen is essentieel om in de opstartfase een goede vasthechting op het polyurethaan te bekomen. Er moeten voldoende polymeren gevormd worden om vasthechting aan het polyurethaan te bevorderen, maar een overdadige productie heeft een negatief effect door hydrodynamische problemen in de reactor. De oorsprong van de koolstofbron is van cruciaal belang om optimale extracellulaire polymeerproductie te bekomen. De beste resultaten werden bekomen bij het voeden met een complex substraat (een mengsel van sucrose, sojaboonolie, zetmeel en vleesextract) (Ribeiro et al., 2005).

3.4 (Bio-)palladium

Palladium wordt gebruikt als katalysator van hydro- en dehydrogeneringsreacties vanwege het grote absorptievermogen voor waterstof en de activering ervan (Livingstone, 1973; Mabbett et al., 2004). Het is verder al lange tijd bekend dat bepaalde micro-organismen in staat zijn om metalen te reduceren. Metalen die niet oplosbaar zijn in gereduceerde vorm, kunnen afgezet worden als nanokristallen op de celwand (Hennebel et al., 2009a). De eigenschap om palladium te reduceren en te precipiteren als bio-palladium is tot nu toe vooral bestudeerd in *Desulfovibrio desulfuricans* (Lloyd et al., 1998) en *Shewanella oneidensis* (De Windt et al., 2005). Lloyd et al (1998) toonden de biologische reductie van Pd(II) naar Pd(0) aan bij *Desulfovibrio desulfuricans* wanneer pyruvaat, formiaat of waterstofgas toegevoegd werd als waterstofdonor. In het geval van *Shewanella oneidensis* ontdekten De Windt et al. (2005) de reductie en precipitatie van nulwaardige Pd nanopartikels zoals te zien is op Figuur 3. Bio-Pd kent een breed toepassingsgebied als katalysator voor de behandeling van gecontamineerde bodem en grondwater, bijvoorbeeld voor de dechlorinatie van polychloorbifenylen (PCB) (De Windt et al., 2005).



Figuur 3: Transmissie elektron microscopische foto van nulwaardige palladium partikels op de celwand van *Shewanella oneidensis* (Hennebel et al., 2009a)

Deel II: Doelstellingen

De industriële toepassingen van anaerobe vergisting worden gelimiteerd door enkele obstakels. Zo is de vergisting van bepaalde substraten zoals keukenafval gebrekkig en daarnaast neemt het herstel van een gefaalde reactor veel tijd in beslag. Daarom zal in dit eindwerk getracht worden een beter inzicht te krijgen in het anaerobe vergistingsproces van moeilijk vergistbare substraten waarbij keukenafval als voorbeeld wordt gebruikt.

Een tweede doelstelling is een correlatie vinden tussen procesparameters en de microbiële gemeenschap in de reactor. Dit zou het mogelijk maken om met eenvoudige moleculaire analyses in praktijk voorspellingen te maken over verschuivingen in de microbiële gemeenschap die de reactor zullen beïnvloeden. Een eenduidige correlatie zou perspectieven bieden om preventief te kunnen handelen om het falen van de reactoren te voorkomen.

Anaerobe vergisting is reeds veelvuldig onderzocht, maar een belangrijk hiaat in het huidig onderzoek betreft het gebrek aan methoden om bij gefaalde reactoren de biogasproductie in situ weer op gang te krijgen. Daarom zullen in dit eindwerk strategieën onderzocht worden om het herstel van gefaalde reactoren te bevorderen, zodat ze sneller terug operationeel kunnen zijn.

Tot slot kan dosering van bepaalde substanties of het veranderen van procesomstandigheden de performantie van een reactor beïnvloeden. De ontwikkeling van een additief of een alternatieve modus operandi om de anaerobe vergisting te optimaliseren zal onderzocht worden gebaseerd op suggesties en aanwijzingen uit de literatuur en praktijk.

Deel III: Materiaal en methoden

Hoofdstuk 1 Fysisch-chemische analysemethoden

1.1 Chemisch zuurstof verbruik

Chemisch zuurstof verbruik (CZV) is een maat voor het gehalte aan chemisch oxideerbare stoffen in watermonsters en geeft de graad van organische vervuiling weer. De analyse is gebaseerd op de oxidatie van zuurstofverbruikende verontreinigingen met een $K_2Cr_2O_7$ oplossing (0,25 N) in zuur milieu. De overmaat $K_2Cr_2O_7$ werd teruggetitreerd met 0,25 N $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ met ferroïne als indicator. $HgSO_4$ werd toegevoegd om interferentie van chloriden te vermijden en Ag_2SO_4 katalyseerde de reactie. Om de CZV verwijderingssnelheid te berekenen, werd de CZV van het effluent afgetrokken van de CZV van het influent (Greenberg et al., 1992).

Om de oplosbare CZV concentratie (CZVs) te bepalen, werden de stalen gefilterd (Grade 597 ½ folded filter, Whatman) alvorens de bovenstaande methode werd toegepast.

Vanaf experiment 2 werd een cuvettest gebruikt (Hach Lange NV, Mechelen, België) waarbij de aflezing gebeurde met behulp van een Colorimeter (DR/700, Hach Company, Loveland, Colorado, VS).

1.2 Droge stof, vervluchtigbare stoffen, totaal gehalte aan stoffen in suspensie en vervluchtigbare stoffen in suspensie

Het totaal gehalte aan stoffen in suspensie (TSS) werd bepaald door een gekend volume staal 10 minuten te centrifugeren bij 1000 rpm. Het supernatans werd gedecanteerd, het residu werd overgebracht in een porseleinen kroesje en gedurende 24 uren gedroogd bij 105°C. Het gewicht van de overblijvende stof gedeeld door het oorspronkelijk volume staal is het TSS gehalte. Vervolgens werd het kroesje gedurende twee uur in een moffeloven verast bij 600°C. Het gewichtsverschil tussen voor en na verassen, is een maat voor het gehalte aan vervluchtigbare stoffen in suspensie (VSS). De bepaling van de concentratie aan droge stof (DS) en vervluchtigbare stoffen (VS) was analoog als de TSS en VSS methode, maar hierbij werd het gekende volume staal volledig in het kroesje gebracht zonder initiële centrifugatie (Greenberg et al., 1992).

1.3 pH

De zuurtegraad werd potentiometrisch bepaald met behulp van een Consort SP10B pH-elektrode aangesloten op een Consort C532 multimeter analyser (Consort, Turnhout, België). Wekelijks werd deze gekalibreerd met behulp van standaardoplossingen met pH-waarden van 7 en 10.

1.4 Alkaliniteitsmeting

Door een staal te titreren met 0,35 N H₂SO₄ tot pH 5,75 werd de partiële alkaliniteit (PA) bepaald. Dit is gerelateerd met de bicarbonaat-alkaliniteit (Jenkins et al., 1983). Titratie van pH 5,75 tot 4,3 resulteerde in de intermediaire alkaliniteit (IA), een maat voor de VVZ alkaliniteit. De totale alkaliniteit is de som van de partiële en de intermediaire alkaliniteit.

De alkaliniteit in mg CaCO₃ L⁻¹ werd berekend volgens onderstaande vergelijking met A het aantal mL zuur, N de normaliteit van het zuur en V het volume van het staal.

$$\text{Alkaliniteit} = \frac{A \times N \times 50\,000}{V}$$

De Ripley-index werd berekend door de intermediaire alkaliniteit te delen door de totale alkaliniteit (Ripley et al., 1986). Een waarde kleiner dan 0,30 voor de Ripley-index is een indicatie dat de vergister optimaal werkt.

1.5 Vluchtige vetzuren

De vluchtige vetzuren (VVZ) werden geanalyseerd met de standaardmethode van Greenberg et al. (1992) op basis van diëthyletherextractie. De analyse van de geëxtraheerde VVZ werd uitgevoerd door 2 µL van het extract in een capillaire gaschromatograaf (GC) te brengen (GC 8000 Carlo Erba Instruments, Wigan, Verenigd Koninkrijk) met split-splitlessinjector en vlamionisatie detector (FID), uitgerust met een Alltech EC-1000 kolom (30m, interne diameter: 0,32 mm, dikte van de film: 0,25 µm, Alltech, Deerfield, Illinois, VS). Het stikstof-dragersgas had een debiet van 3 mL min⁻¹ en de temperatuur werd vastgelegd op 135°C voor de isotherme oven en 200°C voor de detector en injector. Via deze methode werd azijnzuur, propionzuur, (iso)boterzuur, (iso)valeriaanzuur en (iso)capronzuur kwantitatief bepaald voor concentraties van 0 tot 10 g L⁻¹.

1.6 Natriumconcentratie

De natte destructie van 10 mL staal gebeurde na aanzuring met 5 mL HNO₃ en 1 mL H₂O₂ door het staal anderhalf uur te koken bij 150°C. Vervolgens werd er gefiltreerd over een witband filter (640m, diameter 125 mm, Macherey-Nagel, Duitsland) en werd het filtraat opgevangen in een glazen kolfje van 100 mL en aangelengd tot 100 mL met gedemineraliseerd water. Dit werd geanalyseerd op natrium met een inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES) (Varian Vista MPX, Varian, Palo Alto, Californië, VS). Deze methode is gebaseerd op het vernevelen van het staal en atomiseren in een argon plasma. Atomen en ionen worden door het plasma geëxciteerd, waarbij ze een karakteristiek emissiespectrum uitzenden. De optische emissie wordt in de monochromator opgesplitst in de verschillende karakteristieke golflengten van de elementen die in het staal aanwezig zijn. Detectie gebeurt simultaan op een charge coupled device (CCD) detector. Stalen werden indien nodig verdund om binnen de standaardreeks tot 10 mg L⁻¹ te vallen.

1.7 Stikstofconcentratie

De totale concentratie aan organische stikstof werd bepaald met de Kjeldahl-methode. Deze methode is gebaseerd op de omzetting van organische stikstof in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ door middel van destructie bij hoge temperatuur (400°C) met geconcentreerd zwavelzuur en CuSO_4 als katalysator. K_2SO_4 werd toegevoegd om het kookpunt te verhogen. Het ammonium werd in alkalisch midden als ammoniak vrijgesteld, overgedistilleerd en gebonden als boraat. Het stikstofgehalte werd door middel van een zuurbase titratie bepaald. Deze methode werd zoals beschreven door Greenberg et al. (1992) uitgevoerd voor de CTR-stalen (zie 5.1).

Voor de stalen van latere experimenten werd gebruik gemaakt van de directe colorimetrische bepaling volgens Nessler om de stikstofconcentratie in oplossing te bepalen (Greenberg et al., 1992). De Nessler-methode heeft een meetbereik van 0 tot $2 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$. Het staal werd aldus voldoende verdund in een 50 mL maatkolf. Hieraan werd 1 mL kaliumnatriumtartraatoplossing toegevoegd, gevolgd door toevoeging van 1 mL Nessler-reagens. Dit geheel werd gemengd en liet men 10 minuten rusten. Binnen het kwartier werd de gevormde kleur bij een golflengte van 425 nm spectrofotometrisch gemeten met behulp van een UVIKON 932 spectrofotometer (Kontron Instruments, Zwitserland). In iedere reeks stalen werd een blanco staal op dezelfde wijze behandeld, zodat absorptantie ten opzichte van de blanco kon worden bepaald.

1.8 Ijzer- en calciumconcentratie

De bepaling van ijzer en calcium gebeurde na filtratie van het staal door een $0,45 \mu\text{m}$ filter (Millex, Millipore, Massachusetts, VS) door middel van een atoom absorptie spectrometer (AAS) (AA 630, Shimadzu, Frankrijk) bij een golflengte van respectievelijk 248 nm en 422,7 nm in een acetyleen/lucht vlam.

In een AAS schijnt monochromatisch licht in de lengterichting door een breed vlamfront (ca. 10 cm). Na de meting van de intensiteit van het licht zonder monster, wordt in de vlam een hoeveelheid monster gezogen waardoor het aanwezige ijzer of calcium in atomaire toestand overgaat. Het atomaire metaal adsorbeert licht van een specifieke golflengte. De gemeten lichtintensiteit bij die golflengte is afhankelijk van de concentratie van metalen in de vlam en dus van de concentratie van metalen in de monsteroplossing. Vergelijking met de absorptie van standaardoplossingen waarin een bekende hoeveelheid van het metaal zit, laat toe om de onbekende concentratie te berekenen door lineaire interpolatie.

1.9 Anionenanalyse

De bepaling van het sulfaat-, fosfaat-, chloride-, nitraat- en nitrietgehalte gebeurde aan de hand van een ionenchromatograaf (IC 761 Compact, Metrohm, Zwitserland) met een AS9HC kolom en een Metrosep A 4/5 guardkolom. Het eluent bestond uit $1,0 \text{ mM NaHCO}_3$, $3,2 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ en 5 volumeprocent aceton bij een debiet van $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Een standaardhoeveelheid van 1 mL werd gebruikt na filtratie door een $0,45 \mu\text{m}$ filter (Millex, Millipore), waarna er in de IC nog een inline-filtratie van $0,2 \mu\text{m}$ was. De detector werkte aan de hand van elektrochemische conductiviteit.

Hoofdstuk 2 Gasbepalingen

2.1 Biogasproductie

Het geproduceerde biogas van de reactoren werd opgevangen in halfopen geijkte plexiglazen kolommen. Om het oplossen van CO₂ te vermijden, waren de kolommen gevuld met water aangezuurd met HCl tot een pH kleiner dan 3. Kleuring met methyloranje liet toe om een eventuele pH stijging tijdig waar te nemen. De biogasproductie werd afgelezen door de vloeistofverplaatsing in de kolom. De theoretische biogasproductie werd berekend op basis van de CZV concentratie in het influent in de aanname van totale afgisting waarbij 1 g CZV 0,5 L biogas genereert (Aiyuk et al., 2006; Appels et al., 2008).

2.2 Methaan- en koolstofdioxideconcentratie

De methaan- en koolstofdioxideconcentratie in het gas werd bepaald door 1 mL te injecteren in een gaschromatograaf met thermal conductivity detector (TCD) (Shimadzu GC-14B, Shimadzu, Kyoto, Japan), uitgerust met een Hayesep Q 80-100 kolom (2,74 m x 2 mm, Varian). De integrator (Shimadzu C-R8A, Shimadzu) zette het verkregen signaal om naar gassamenstelling.

Hoofdstuk 3 Microbiële analysemethoden

3.1 DNA-extractie

De nucleïnezuurextractie is gebaseerd op de hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)-methode (Boon et al., 2003). In een 2 mL Eppendorf buisje werden 0,5 g zirconia/silica beads met diameter 0,1 mm (B. Braun Biotech International, Melzungen, Duitsland) samengebracht met 1 mL slib, 0,5 mL CTAB buffer (10% wt/vol CTAB, 0,7 M NaCl en 240 mM KH₂PO₄ [pH 8,0]) en 0,5 mL fenol-chloroform-isoamylalcohol mengsel (25:24:1) om de proteïnen te precipiteren. Dit geheel werd drie keer 30 seconden gehomogeniseerd bij 5000 rpm in een Beadbeater (B. Braun Biotech International) met 20 seconden koelen op ijs tussen de homogenisaties. Vervolgens werden de Eppendorf buisjes gecentrifugeerd (5 min bij 3000 g) en 400 µL van het supernatans werd getransfereerd naar een Eppendorf buisje waaraan 400 µL chloroform-isoamyl alcohol (24:1) werd toegevoegd om fenol te verwijderen. Na het buisje enkele keren te inverteren, werd het gecentrifugeerd voor 30 seconden bij 1050 g. 350 µL van de bovenste, waterige fase werd getransfereerd naar een nieuw Eppendorf buisje en de chloroform-isoamyl alcohol wasstap werd herhaald. Na de bovenste fase naar een nieuw buisje overgebracht te hebben, werden 2 volumes 30% wt/vol polyethyleen glycol (PEG) 6000 - 1,6 M NaCl toegevoegd om de nucleïnezuuren te precipiteren. Na 2 uur incubatie bij kamertemperatuur (22°C) werden de buisjes gecentrifugeerd bij 16 000 g gedurende 20 minuten. De nucleïnezuur-pellet werd gewassen met ijskoud 70% (vol/vol) ethanol waarna de centrifugatie en de wasstap herhaald werden. Na 20 minuten drogen onder vacuüm in de Speed Vacuum dryer (Savant, GMI Inc., Minnesota, VS) werd de pellet geresuspendeerd in 50 µL water behandeld met diethylpyrocarbonaat (DEPC).

De nucleïnezuurconcentratie en de zuiverheid werden spectrofotometrisch bepaald met behulp van Nanodrop (ND-1000, Isogen Life Science).

3.2 PCR

3.2.1 PCR *Bacteria*

Voor de polymerase chain reaction (PCR) werden de primers 338F-GC (5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3') en 518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') gebruikt voor de amplificatie van het variabel gebied 3 van 16rRNA fragmenten van *Bacteria*. De gebruikte analyse was gebaseerd op het protocol van Siddique et al. (2005) met kleine aanpassingen ter optimalisatie. Een 5' GC-klem op de 338F primer werd toegevoegd voor de DGGE analyse en de gebruikte mastermix was afkomstig van Fermentas (Fermentas, Burlington, VS). De mastermix was samengesteld uit 77,25 µL PCR water, 10 µL PCR buffer (10x), 6 µL MgCl₂, 2 µL deoxyribonucleotide trifosfaat (dNTP), 2 µL primer 338F-GC, 2 µL primer 518R, 0,25 µL bovine serum albumine (BSA) en 0,5 µL Taq desoxyribonucleïnezuur (DNA) polymerase. De verhouding tussen staal en mastermix was 1 µL op 24 µL. Het temperatuursprogramma dat aangewend werd in de PCR mini cycler (Biozym, Landgraaf, Nederland): 94°C (5'), [95°C (1'), 53°C (1'), 72°C (2')] x 30, 72°C (10'), 4°C (∞). De PCR-producten werden bewaard bij -20°C.

3.2.2 PCR *Archaea*

De gebruikte PCR-analyse voor *Archaea* was een aanpassing op het protocol van Rooney-Varga et al. (2007). De primers 915F (5' AAA GGA ATT GGC GGG GGA GCA C 3') en 1352aR-GC (5' GAC GGG CGG TGT GTG CA 3') werden gebruikt voor de amplificatie. Op de 1352aR-primer was een GC-klem aanwezig voor de verdere DGGE-analyse. De mastermix van Promega (Promega Corporation, Madison, VS) werd gebruikt in een verhouding van 24 µL mastermix per µL staal. De samenstelling van de mastermix was 72,8 µL PCR water, 21 µL Go Taq buffer (5x), 2,1 µL dNTP, 1 µL primer 915F (50µM), 1 µL primer 1352aR-GC (50µM), 1,6 µL BSA en 0,5 µL Go Taq polymerase. Voor de amplificatie werd volgend temperatuursprogramma doorlopen in de PCR mini cycler: 95°C (5'), [94°C (1'), 62°C (1'), 72°C (1')] x 30, 72°C (10'), 4°C (∞). De PCR-producten werden bewaard bij -20°C.

3.3 Agarose gel elektroforese

De DNA-extractie en PCR-amplificatie werden gecontroleerd via 1% (wt/vol) agarose gel elektroforese in een 0,5x TAE (trisacetaat-ethyleendiaminetetra-azijnzuur) bufferoplossing. Het DNA werd gekleurd met behulp van 1% ethidiumbromide wat zichtbaar wordt bij 590 nm. Als referentie werd MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) gebruikt. De gel werd in een 0,5x TAE bufferoplossing geplaatst in een i-Mupid toestel (Cosmo Bio Company, Tokyo, Japan). De elektroforese werd gedurende 20 minuten uitgevoerd bij 100 Volt waarna een foto werd gemaakt onder ultraviolet (UV) belichting (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, Frankrijk).

3.4 DGGE

3.4.1 DGGE *Bacteria*

De bekomen PCR-producten werden geanalyseerd via denaturerende gradiënt gel elektroforese (DGGE). Dit protocol was gebaseerd op de methode van Muyzer et al. (1993). Per analyse werd 15 µL (10 µL staal en 5 µL ladingsbuffer) geladen op 8% wt/vol polyacrylamide gel in 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM acetaat, 2 mM ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA), pH 7,4). De gel werd gemaakt met een denaturerende gradiënt van 45% tot 60%, waarbij 100% denaturerend product bestaat uit 24% formamide en 4 M ureum. Onderaan de gel werd een bodemgel (2 mL 60% denaturerende oplossing, 40 µL 10% ammoniumpersulfaat, 2 µL tetramethylethyleendiamine) aangebracht om lekken te voorkomen. De elektroforese werd gedurende 16 uur uitgevoerd bij 38 Volt en 60°C. Daarna werd de gel 20 minuten gekleurd in 200 mL TAE 1x waaraan 16 µL SYBR Green I (Invitrogen, VS) werd toegevoegd. Vervolgens werd de gel gefotografeerd onder UV licht.

3.4.2 DGGE *Archaea*

De DGGE-gel voor *Archaea* had een denaturerende gradiënt van 50% tot 65% en onderaan een bodemgel van 65% denaturerende gel. De elektroforese werd gedurende 16 uur uitgevoerd bij 70 Volt en 60°C. Per analyse werd 10 µL (8 µL staal en 2 µL ladingsbuffer) geladen op 6% wt/vol polyacrylamide gel in 1x TAE. Vervolgens werd de gel 20 minuten gekleurd in 200 mL TAE 1x waaraan 16 µL SYBR Green I (Invitrogen, VS) werd toegevoegd. Tot slot werd de gel gefotografeerd met UV belichting.

3.5 Statistische analyses

Normalisatie en analyse van de verkregen DGGE-patronen werd uitgevoerd met BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, België). Hierbij werden de verschillende banen gedefinieerd, de achtergrond verwijderd en verschillen tussen patronen gedetecteerd. Voor de interpretatie werd de methode gevolgd opgesteld door Marzorati et al. (2008).

3.5.1 Bereik-gewogen rijkdom

De bereik-gewogen rijkdom (R_r) geeft de capaciteit van het ecosysteem weer. Deze parameter wordt berekend volgens de formule:

$$R_r = N^2 \times D_g$$

N geeft hierin het totaal aantal banden in het DGGE-patroon weer en D_g is de denaturerende gradiënt tussen de eerste en de laatste band van het patroon.

Wanneer R_r kleiner is dan 10, wordt dit toegeschreven aan een moeilijk koloniseerbare omgeving zoals vervuilde bodem. Zeer bewoonbare milieus worden gekarakteriseerd door een R_r groter dan 30, wijzend op een hoge microbiële diversiteit.

3.5.2 Dynamiek van verandering

De dynamiek van verandering (Dy) kan geïnterpreteerd worden als het aantal species dat gemiddeld tot een significante dominantie komt (boven de detectielimiet van de techniek) in een gegeven habitat in een welbepaald tijdspanne. Bionumerics berekent een matrix van similariteit-waarden op basis van de densiometrische curven van de DGGE-patronen. Via onderstaande vergelijking kunnen deze percentages dan omgerekend worden naar het percentage verandering.

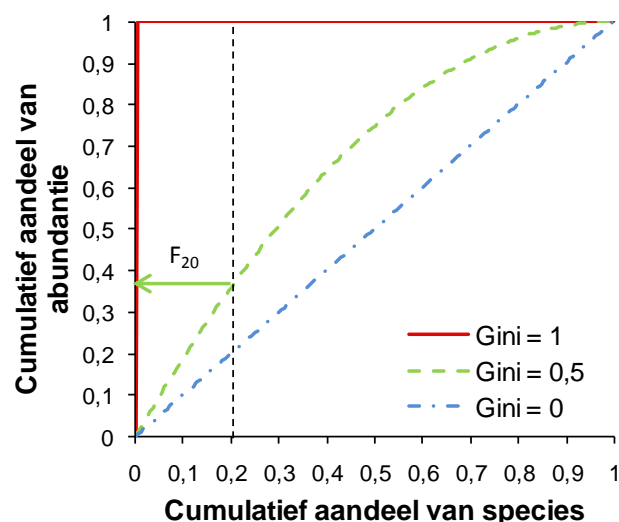
$$\% \text{ verandering} = 100 - \% \text{ overeenkomst}$$

Door deze percentages uit te zetten tussen opeenvolgende staalname-momenten, kan de snelheid van verandering berekend worden.

3.5.3 Functionele organisatie

Om een grafische weergave te geven van de functionele organisatie (Fo) van een microbiële gemeenschap, kan een Lorenz-curve geconstrueerd worden. Hiervoor worden de banden uit een DGGE-laan gerangschikt van hoge naar lage intensiteit. Vervolgens wordt het cumulatief genormaliseerde aantal banden uitgezet in de x-as en de respectievelijk cumulatief genormaliseerde intensiteit weergegeven in de y-as. Hoe meer de curve afwijkt van de 45° diagonaal (theoretisch perfecte gelijkheid), hoe minder gelijkheid kan waargenomen worden in de structuur van de bestudeerde gemeenschap. Een hoge gelijkheid stemt overeen met een lage functionele organisatie.

Twee parameters worden toegepast om de taakverdeling te karakteriseren aan de hand van de Lorenz-curven. Enerzijds geeft de Gini-coëfficiënt weer wat het oppervlak is dat gelegen is onder de curve ingesloten door de Lorenz-curve en de 45° lijn van perfect evenredige verdeling. Hoe groter de Gini, hoe meer gespecialiseerd de gemeenschap is. Anderzijds is de F_{20} een maat voor hoeveel werk er verricht wordt door meest actieve 20% van de microbiële gemeenschap. Als de F_{20} hoog is, wijst dit op meer specialisatie bij de micro-organismen.



Figuur 4: Verschillende Lorenz-curven en de overeenkomstige Gini-coëfficiënt (Wittebolle et al., 2009)

Hoofdstuk 4 Bio-palladium productie

4.1 Stockoplossingen en media

Voor de Pd-stockoplossing werd Pd(II) toegevoegd onder de vorm van $\text{Na}_2\text{Cl}_4\text{Pd}$. Van dit poeder werd 414,8 mg opgelost in 10 mL milliQ-water zodat een stockoplossing van 15 mg ml^{-1} werd verkregen. Hiervan werd het juiste volume aan de behandeling toegevoegd om de gewenste concentratie te krijgen. Natriumformiaat werd gebruikt als elektrondonor. Hiervoor werd een formiaat-stockoplossing van 5 M natriumformiaat in milliQ-water aangemaakt.

Shewanella oneidensis MR-1 werd bekomen uit de BCCM/LMG Bacterium Collection (Gent, België) onder het nummer LMG 19005. De cultuur werd bewaard in een 40% glyceroloplossing bij -80°C .

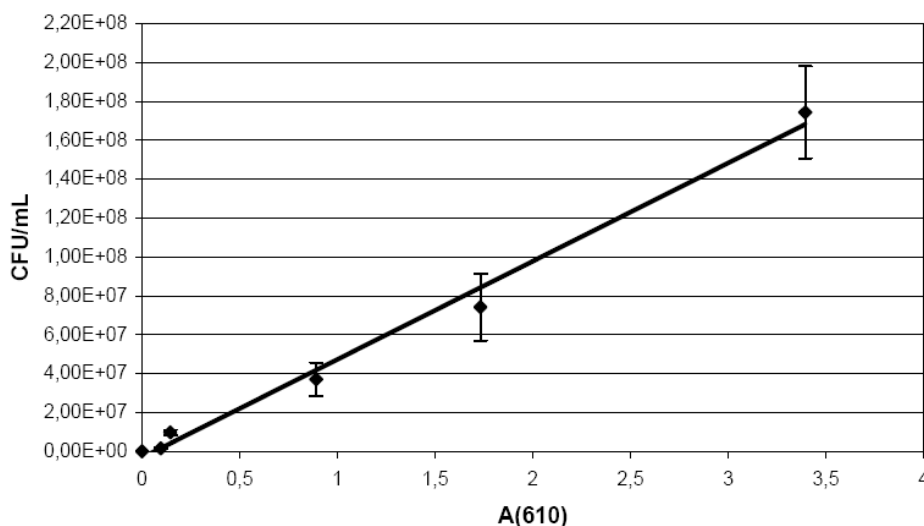
Luria-Bertani-medium (LB-medium) werd gebruikt voor het opgroeien van de bacteriën. Het werd bereid door het oplossen van 10 g trypton, 5 g gistextract en 5 g NaCl in gedistilleerd water. Het medium werd vóór inoculatie geautoclaveerd. Het minimaal medium (M9-medium) is samengesteld uit $8,5 \text{ g L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $3 \text{ g L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{NaCl}$ en $1 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ (M9-zouten) aangevuld met $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{MgSO}_4$ en $0,011 \text{ g L}^{-1} \text{CaCl}_2$ en aangelengd met milliQ water.

4.2 Opgroeien en oogsten van *Shewanella oneidensis*

Er werd 1 mL van de celcultuur op steriele wijze toegevoegd aan 1 L steriel LB-medium in een erlenmeyer. De erlenmeyer met LB-medium werd overnacht geschud bij 28°C . Het schudden zorgde voor voldoende zuurstofconcentratie en nutriëntenverdeling in de erlenmeyer om zo een cultuur in de stationaire fase te verkrijgen.

LB-medium bevat componenten waaronder chloriden en zwavelverbindingen die kunnen interfereren met de katalysatoractiviteit van palladium. De celsuspensie werd gedurende 6 minuten gecentrifugeerd bij 4100 g. Vervolgens werden de cellen gewassen met M9-medium; de pellet werd terug opgelost in het M9-medium waarna de celsuspensie een tweede maal werd gecentrifugeerd gedurende 6 minuten bij 4100 g. Uiteindelijk werden de cellen opgelost aan de gewenste concentratie in M9-medium.

De celconcentratie van de suspensie werd spectrofotometrisch bepaald door de absorbantie te bepalen bij 610 nm (Dr. Lange, Noisy le Grand Cedex, France). De celconcentratie in de suspensie is in een bepaald gebied recht evenredig met de absorbantie. Aeltermann (2004) bepaalde dit verband aan de hand van uitplatingen van suspensies met een bepaalde optische densiteit (OD) op LB-medium. Figuur 5 geeft het verband tussen de OD en de colony forming units (CFU) mL^{-1} . De gewenste celconcentratie werd verkregen door het bepalen van de OD en eventuele verdunning met M9-medium.



Figuur 5: Verband tussen de absorbantie bij 610 nm en de celconcentratie (CFU mL⁻¹) met $y = 5.107x - 3.106$ en $R^2 = 0,991$ (Aelterman, 2004)

4.3 Microbiële reductie van palladium

Een gewenst volume van de celsuspensie werd in Schott flessen van 1 L gebracht. Er werd formiaat toegevoegd zodat de uiteindelijke concentratie 50 mM bedroeg. Formiaat fungeerde als elektrondonor voor de bacteriën. De flessen werden gedurende 1 uur geïncubeerd zodat formiaat door de cellen kon worden opgenomen. Nadien werd een juiste hoeveelheid Pd(II) stockoplossing toegevoegd en werden de flessen onmiddellijk geschud zodat de reductie van het palladium volledig was. Na 2 uur werd de microbiële reductie van Pd(II) en de vorming van Pd(0) kristallen volledig geacht. De suspensie werd gedurende 5 minuten bij 4920 g afgecentrifugeerd. De pellet werd vervolgens gewassen met gedestilleerd water en finaal opgelost in gedestilleerd water.

Hoofdstuk 5 Experimentele opstellingen

5.1 Continue tank reactoren

Het totale reactorvolume van de continue tank reactoren (CTR) was 25 L en het vloeistofvolume 18 L. De thermofiele reactoren werden bij 53°C geïncubeerd, de mesofiele reactoren bij 34°C. Voor de opstart werd 16 L anaeroob slib gebruikt per reactor en de initiële biomassaconcentratie in de reactor was 35 g VS L⁻¹. Het thermofiel slib was afkomstig van Bio Electric in Beernem, een thermofiele anaerobe installatie waar varkensdrijfmest verwerkt wordt in combinatie met organische cosubstraten. Het mesofiel entslib kwam van rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI) Ossemeersen in Gent.

De reactoren werden één keer per dag gevoed met keukenafval verdund met huishoudelijk afvalwater eveneens afkomstig van RWZI Ossemeersen. Het gebruikte keukenafval werd verkregen via Trans Vanheede uit Wervik, een ophalingsbedrijf voor bedrijfsafval onder andere van grootkeukens. Gemiddeld waren de karakteristieken van het keukenafval een CZV concentratie van 215 g totale CZV (CZVt) kg^{-1} en 75 g CZVs kg^{-1} , 166 g DS kg^{-1} , 155 g VS kg^{-1} en pH 4. De voedingsnelheid was 1 L d^{-1} , waardoor de hydraulische verblijftijd in de reactoren 18 dagen was. De alkaliniteit van de reactoren werd constant gehouden op 0,1 mol L^{-1} NaHCO_3 door NaHCO_3 toe te voegen.

Het eerste experiment werd uitgevoerd in vier anaerobe reactoren. CTR A was de thermofiele controle reactor met een constante organische volumetrische belasting (OVb) van ongeveer 2 g CZV $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$. CTR B was de thermofiele reactor die een stijgende OVb toegediend kreeg. Analoog was CTR C de mesofiele controle reactor en CTR D de mesofiele reactor met stijgende OVb. Oorspronkelijk was er slechts één mesofiele reactor die op dag 58 werd gesplitst in CTR C en CTR D door 7 L van de gemengde vloeistof uit de mesofiele reactor aan te lengen met 7 L mesofiel slib en 4 L water. Dagelijks werden de reactoren manueel geschud vlak voor de staalname.

In een tweede experiment vanaf dag 133 werd de bedrijfsvoering van de mesofiele reactoren C en D geoptimaliseerd tot een continuous stirred tank reactor (CSTR). Dit werd bekomen door het installeren van mechanische mixers (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) die 5 minuten per uur voor menging van de reactorinhoud zorgden. Verder werd de reactorinhoud minstens een half uur ongemengd gelaten voor het effluent gedecanteerd werd om uitwassing van biomassa te voorkomen. De reactoropstelling is weergegeven in Figuur 6. De twee mesofiele CSTR-reactoren werden opgestart op dag 100 door 9 L gemengde vloeistof van de samengevoegde inhoud van de mesofiele CTR-reactoren aan te lengen met 5 L nieuw mesofiel slib en 4 L water, maar het mengen en de voeding werden pas gestart op dag 133 om de reactoren eerst voldoende te laten herstellen van het voorgaande experiment.



Figuur 6: Opstelling CSTR-reactoren

5.2 Batchreactoren

De batchexperimenten werden uitgevoerd in 1 of 2 L erlenmeyers afgesloten met een rubberen stop zoals op Figuur 7 te zien is. In de stop was een klein buisje aangebracht om het biogas te verzamelen in een gaskolom. In geval menging noodzakelijk was, werden deze reactoren geroerd door middel van een magnetische roerder (Labinco L23, Labinco BV, Breda, Nederland). Het geproduceerde biogas werd in een geijkte halfopen gaskolom opgevangen. De mesofiele reactoren werden geïncubeerd bij 34°C, de thermofiele bij 52°C. In de twee experimenten om herstel van gefaalde reactoren te testen, werd er niet gevoed. Wanneer optimalisatie van het anaerobe proces werd onderzocht, werden er pulsvoedingen of continue voedingen gehanteerd.



Figuur 7: Opstelling batchreactoren

5.2.1 Effect van ijzersulfaat op herstel van gefaalde reactoren

Twee batchreactoren van 2 L werden opgestart om het effect van ijzersulfaat op het herstel van gefaalde vergisters te onderzoeken. De reactoren werden mesofiel geïncubeerd en bestonden uit 2 L gemengde vloeistof afkomstig van gefaalde reactoren uit het labo. Bij de controlereactor werd gewacht op spontaan herstel. De behandlungsreactor kreeg initieel een boost-dosis toegediend van 0,5 g FeSO_4 (Iron(II)sulphate heptahydrate, technical grade, VWR, Leuven, België). Voor de rest van het experiment werd de reactor behandeld met 0,01 g $\text{FeSO}_4 \text{ d}^{-1}$ om na te gaan of dit een versnellend effect had op het herstel.

5.2.2 Effect van micronutriënten in de vorm van methanostim liquide op herstel van gefaalde reactoren

Om het effect van methanostim liquide (ML) (Avecom, Wondelgem, België) op het herstel van gefaalde anaerobe reactoren te testen, werden er 10 batchtesten opgezet in 1 L erlenmeyers. Er werd gekozen om voor de mesofiele testen met gemengde vloeistof uit de controle mesofiele reactor (CTR C) te werken en voor de thermofiele testen met gemengde vloeistof uit de controle thermofiele reactor (CTR A). De gemengde vloeistof werd op dag 106 genomen van het experiment besproken in 5.1 op het moment dat er al enige tijd geen biogasproductie meer was in de reactoren. Twee verschillende toedieningswijzen van ML (dagelijks en wekelijks) en twee verschillende hoeveelheden (default: $1\mu\text{L ML L}_r^{-1} \text{d}^{-1}$, boost: $15\mu\text{L ML L}_r^{-1} \text{d}^{-1}$) werden uitgetest, zoals samengevat in Tabel 4. De gebruikte ML bevatte 40 kg gistextract, 1150 kg FeCl_3 40% oplossing (816 L), 20 kg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 200 kg van een 40% citroenzuuroplossing (168L) per m^3 . De reactoren werden, uitgezonderd de ML-dosissen, niet gevoed tijdens dit experiment. Het ganse experiment liep 48 dagen, waarvan de eerste 18 dagen ML werd toegediend volgens bovenstaande strategieën en de laatste 30 dagen niets meer werd toegevoegd om het effect van de reeds toegediende dosissen te bestuderen.

Tabel 4: Indeling reactoren voor bestuderen van herstellend effect ML op gefaalde reactoren

Reactor	Karakterisering	Dosis ML
R1	Mesofiel, Controle	Geen toevoeging
R2	Mesofiel, Default, dagelijks	$1\mu\text{L L}^{-1} \text{d}^{-1}$
R3	Mesofiel, Boost, dagelijks	$15\mu\text{L L}^{-1} \text{d}^{-1}$
R4	Mesofiel, Default, wekelijks	$7\mu\text{L L}^{-1} \text{w}^{-1}$
R5	Mesofiel, Boost, wekelijks	$105\mu\text{L L}^{-1} \text{w}^{-1}$
R6	Thermofiel, Controle	Geen toevoeging
R7	Thermofiel, Default, dagelijks	$1\mu\text{L L}^{-1} \text{d}^{-1}$
R8	Thermofiel, Boost, dagelijks	$15\mu\text{L L}^{-1} \text{d}^{-1}$
R9	Thermofiel, Default, wekelijks	$7\mu\text{L L}^{-1} \text{w}^{-1}$
R10	Thermofiel, Boost, wekelijks	$105\mu\text{L L}^{-1} \text{w}^{-1}$

Bij aanvang van het experiment produceerden de reactoren geen biogas, dus het herstel van de biogasproductie werd opgevolgd. Daarnaast werden wekelijks pH, CZVs en VVZ gecontroleerd.

5.2.3 Bijdrage van micronutriënten in verbetering van anaerobe vergisting

Het doel van dit experiment was nagaan in welke mate micronutriënten in de vorm van ML een positieve invloed kunnen hebben op de anaerobe vergisting van keukenafval. Twee vormen van ML werden gebruikt, waarbij ML-A bestond uit 8% citroenzuur en ML-B uit een hogere citroenzuurconcentratie van 12%.

Drie batchreactoren (2 L) werden opgestart: controle, behandeling 1 (met ML-A) en behandeling 2 (met ML-B). De reactoren werden geïnoculeerd met mesofiel slib ($\approx 10 \text{ g VS L}^{-1}$) en werden bij 35°C geopereerd, met een HRT van 20 dagen en een initiële OVB van ongeveer $1 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Op dag 28, dag 49 en dag 56 werd de OVB verhoogd tot respectievelijk 3, 4 en $5 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

De voeding van de reactor was keukenafval verdund met huishoudelijk afvalwater zoals in 5.1 beschreven werd. De pH van de reactoren werd gecontroleerd door aanpassen van de pH van de voeding met NaOH (10 N). 3 g L^{-1} natriumbicarbonaat werd aan het begin van het experiment toegevoegd. De ML werd in dosissen van $1 \mu\text{L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ toegevoegd. De reactoren werden 3 keer per week gevoed en ML werd op wekelijkse basis toegevoegd. Biogasproductie, pH, CZV en VVZ werden opgevolgd.

5.2.4 Optimalisatie van de anaerobe vergisting

In dit experiment werden meerdere strategieën uitgetest om de anaerobe vergisting te optimaliseren (Tabel 5).

De mogelijke toepassing van calciumperoxide om micro-aeratie te bekomen in de anaerobe vergisting werd in dit experiment nagegaan. Calciumperoxide wordt in de bodemsanering vaak aangewend om langzame zuurstofdosing te bekomen. Om de benodigde dosis calciumperoxide te bepalen, bleek uit literatuur (van der Zee et al., 2007; Buyle, 2008) dat $700 \text{ mL lucht L}_r^{-1}\text{d}^{-1}$ een gunstige invloed had op de anaerobe vergisting. Lucht bevat 21% zuurstof, dus $700 \text{ mL lucht L}_r^{-1}\text{d}^{-1}$ komt overeen met $147 \text{ mL O}_2 \text{ L}_r^{-1}\text{d}^{-1}$. Rekening houdend met het molair gasvolume ($22,4 \text{ L mol}^{-1}$), geeft dit $0,00656 \text{ mol O}_2 \text{ L}_r^{-1}\text{d}^{-1}$ of $0,21 \text{ g O}_2 \text{ L}_r^{-1}\text{d}^{-1}$. Het gebruikte calciumperoxide bevatte 17,3% beschikbaar zuurstof (Solvay Chemicals, Brussel, België). Er werd dus $0,21 \text{ g O}_2 \text{ L}_r^{-1}\text{d}^{-1} / 0,173 = 1,21 \text{ g CaO}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ toegevoegd. Deze dosis werd op wekelijkse basis toegevoegd aan de 1 L reactor, dus $8,5 \text{ g CaO}_2$ per week. De toevoeging in het uitgevoerde experiment gebeurde op dag 1 en dag 10, maar daarna werd de dosering van calciumperoxide stopgezet wegens een negatief effect op de biogasproductie.

Gereticuleerd polyurethaan bevordert de biomassaretentie en biedt de microbiële gemeenschap de kans om in een vaste structuur te nestelen. Er werd nagegaan of dit ook in de beschreven batchreactoren een positieve invloed kan hebben.

Ten slot werd er nagegaan of toevoegen van Pd(0), in de vorm van bio-palladium, of Pd(II), als zout, de gasproductie in batchreactoren kan bevorderen of inhiberen. Pd(II) werd in de vorm van $\text{Na}_2\text{Cl}_4\text{Pd}$ toegevoegd.

Tabel 5: Indeling reactoren voor onderzoek naar optimalisatie van anaerobe vergisting

Reactor	Karakterisering
M1	Controle
M2	8,5 g Calciumperoxide/week
M3	Gereticuleerd polyurethaan met een volume van 200 mL
M4	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Palladium(II)
M5	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Palladium(II)
M6	1 mg L^{-1} Palladium(II)
M7	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Bio-Palladium
M8	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Bio-Palladium
M9	1 mg L^{-1} Bio-Palladium

De 9 batchreactoren werden geïnoculeerd met 10 g VS L^{-1} (mesofiel slib van Ossemeersen in Gent) en initieel werd 3 g $\text{NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$ toegevoegd om voldoende alkaliniteit in de reactoren te garanderen. Het substraat was natrium-propionzuur en de voeding werd op dezelfde temperatuur en pH gebracht als de reactoren. Op dag 1, 10, 14, 21, 31 en 62 werd respectievelijk 3 g CZV L^{-1} , 3 g CZV L^{-1} , 4,5 g CZV L^{-1} , 4,5 g CZV L^{-1} , 7 g CZV L^{-1} , 12 g CZV L^{-1} en 30 g CZV L^{-1} gevoed waarna gewacht werd tot de vergisting compleet was alvorens opnieuw te voeden. Als parameters werden biogasproductie, pH, CZVs en VVZ opgevolgd.

Deel IV: Resultaten

Hoofdstuk 1 Anaerobe vergisting van keukenafval

1.1 CTR A: Thermofiele controlereactor, constante OVB van ongeveer 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹

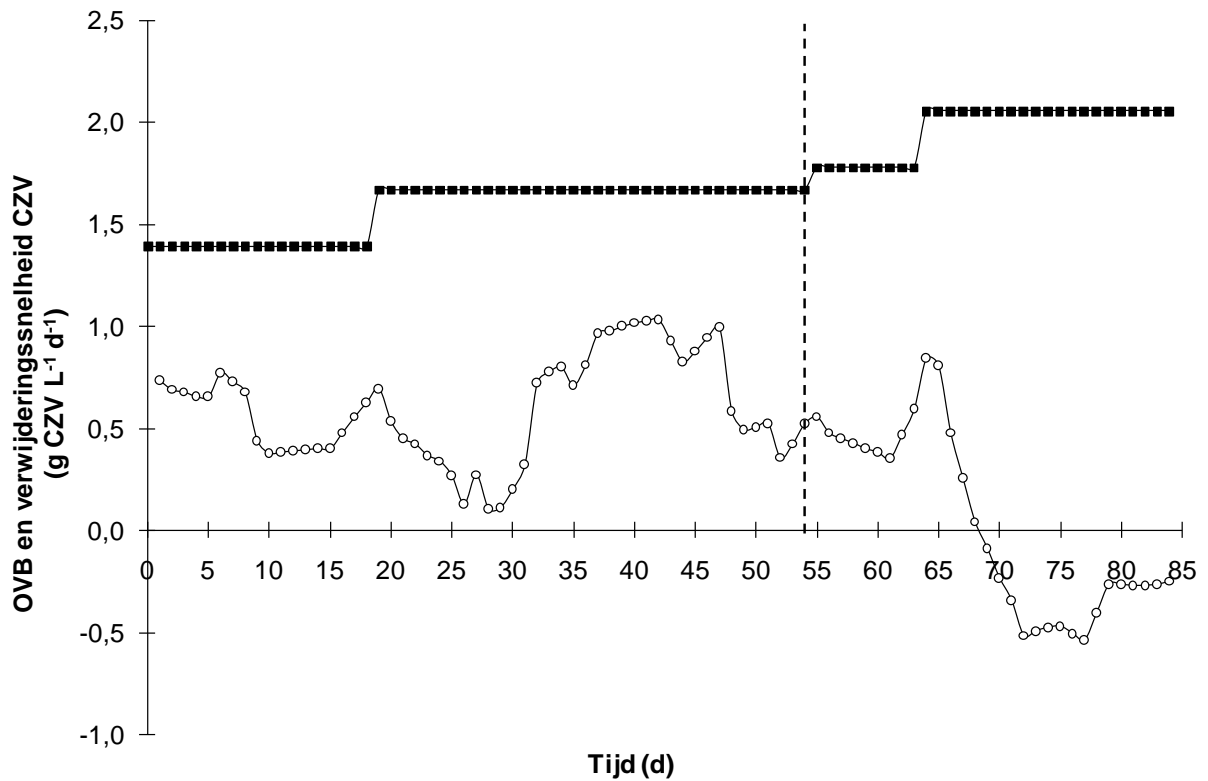
In de thermofiele controlereactor CTR A werd de organische volumetrische belasting constant gehouden op ongeveer 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Figuur 8 tot en met Figuur 11 tonen de resultaten van CTR A met behulp van de volgende parameters: organische volumetrische belasting, CZV verwijderingssnelheid, gemeten en theoretische biogasproductie, residuele totale CZV concentraties en CZV concentraties in oplossing. Analyses van de oplosbare CZV concentratie werden pas vanaf dag 19 uitgevoerd.

Fase 1 (dag 0 - dag 54)

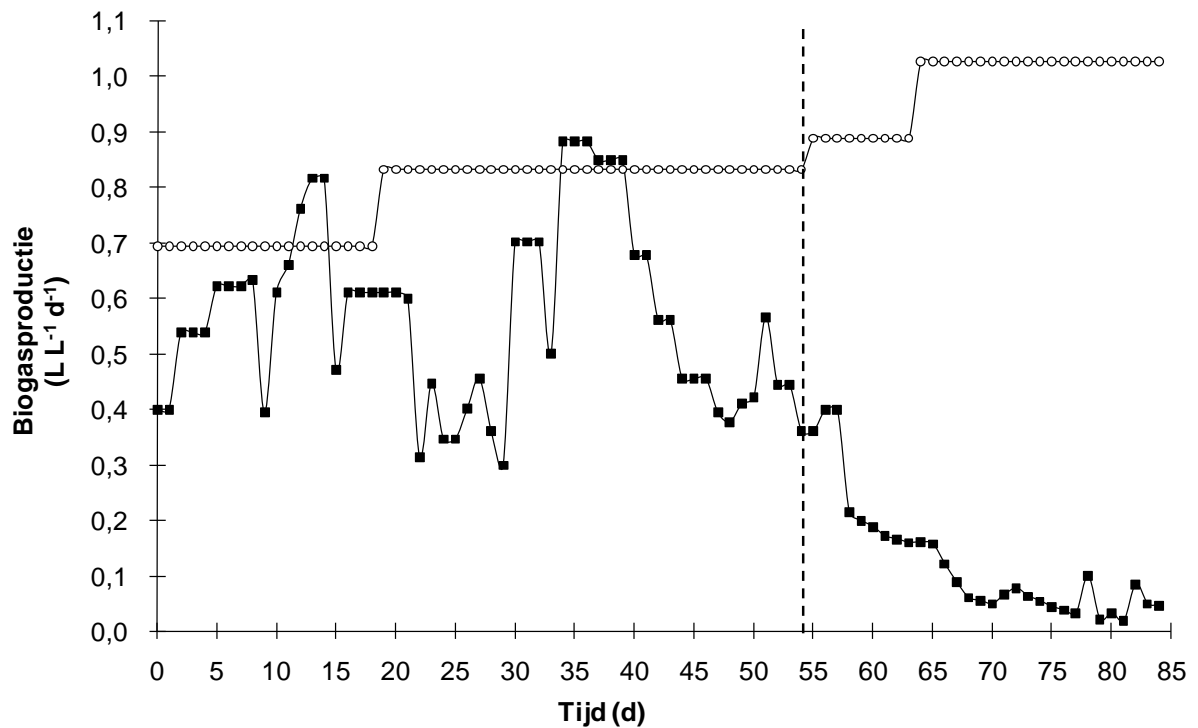
De eerste fase van de thermofiele controlereactor liep tot dag 54 waarbij de OVB stapsgewijs werd verhoogd tot 1,7 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De reactor functioneerde goed tijdens deze fase. De biogasproductie schommelde rond 0,6 L L⁻¹ d⁻¹, 75% van de theoretisch verwachte biogasproductie berekend op basis van de CZV concentratie in het influent in het geval van volledige vergisting. Vanaf dag 40 daalde de biogasproductie enigszins, maar stabiliseerde vanaf dag 44 rond 0,4 L L⁻¹ d⁻¹. De CZV verwijderingssnelheid schommelde rond 0,5 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De totale CZV concentratie in het effluent lag tussen 15 en 30 g CZV L⁻¹, de oplosbare CZV concentratie was ongeveer 5 g CZV L⁻¹. Initieel was de propionzuurconcentratie 1 g propionzuur-CZV (HPr-CZV) L⁻¹, maar na adaptatie van de reactor nam deze concentratie af tot 0,2 g HPr-CZV L⁻¹. Vanaf dag 40 begon de propionzuurconcentratie te stijgen, maar in deze eerste fase bleef het minder dan 2 g HPr-CZV L⁻¹, wat als maximale grens werd gebruikt om van een goed werkende thermofiele vergister te spreken.

Fase 2 (dag 55 - dag 84)

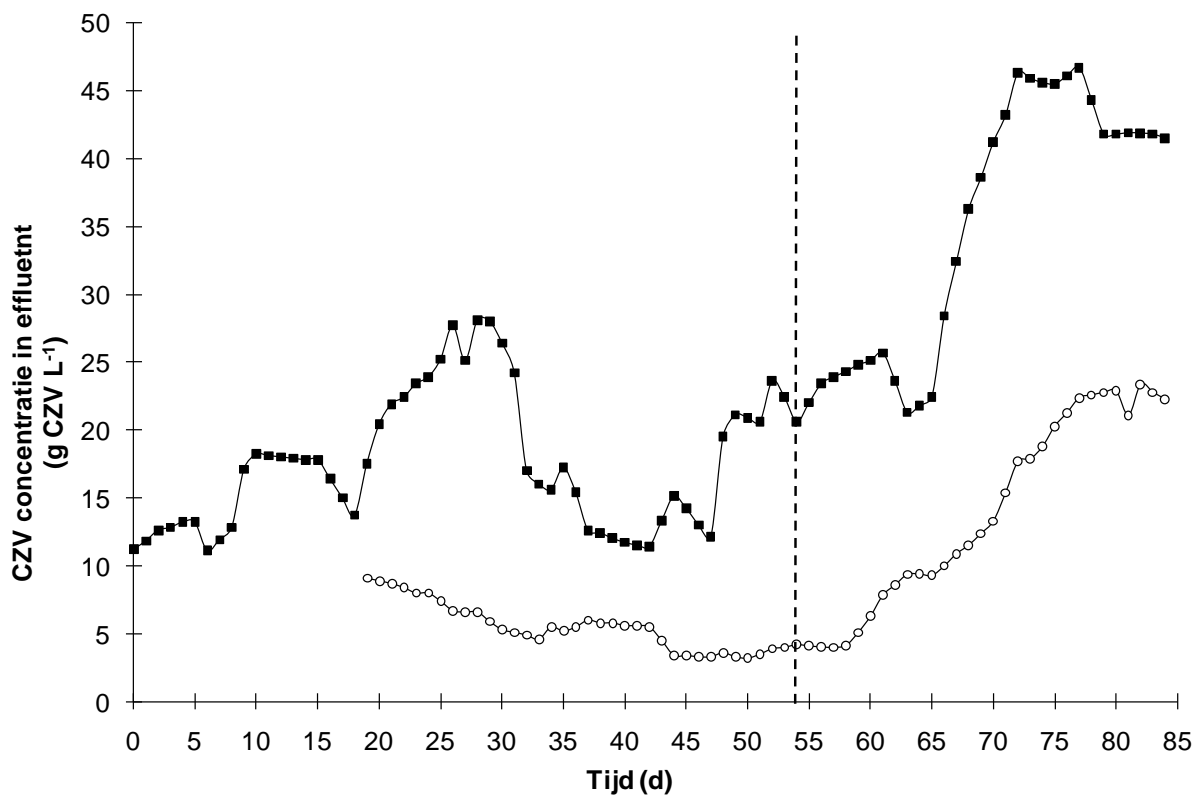
Op dag 55 werd de OVB verhoogd van 1,7 g CZV L⁻¹ d⁻¹ naar 1,8 g CZV L⁻¹ d⁻¹ en op dag 65 naar 2,1 g CZV L⁻¹ d⁻¹. In deze tweede fase vanaf dag 55 faalde de reactor aangezien de biogasproductie daalde tot minder dan 0,1 L L⁻¹ d⁻¹. Bovendien was er accumulatie van CZV waarneembaar tot 45 g totale CZV L⁻¹ en 20 g oplosbare CZV L⁻¹, met een negatieve verwijderingssnelheid als gevolg. De propionzuurconcentratie nam toe tot 3 g HPr-CZV L⁻¹. Aangezien de reactor duidelijk verziekt was, werd dit experiment op dag 84 beëindigd.



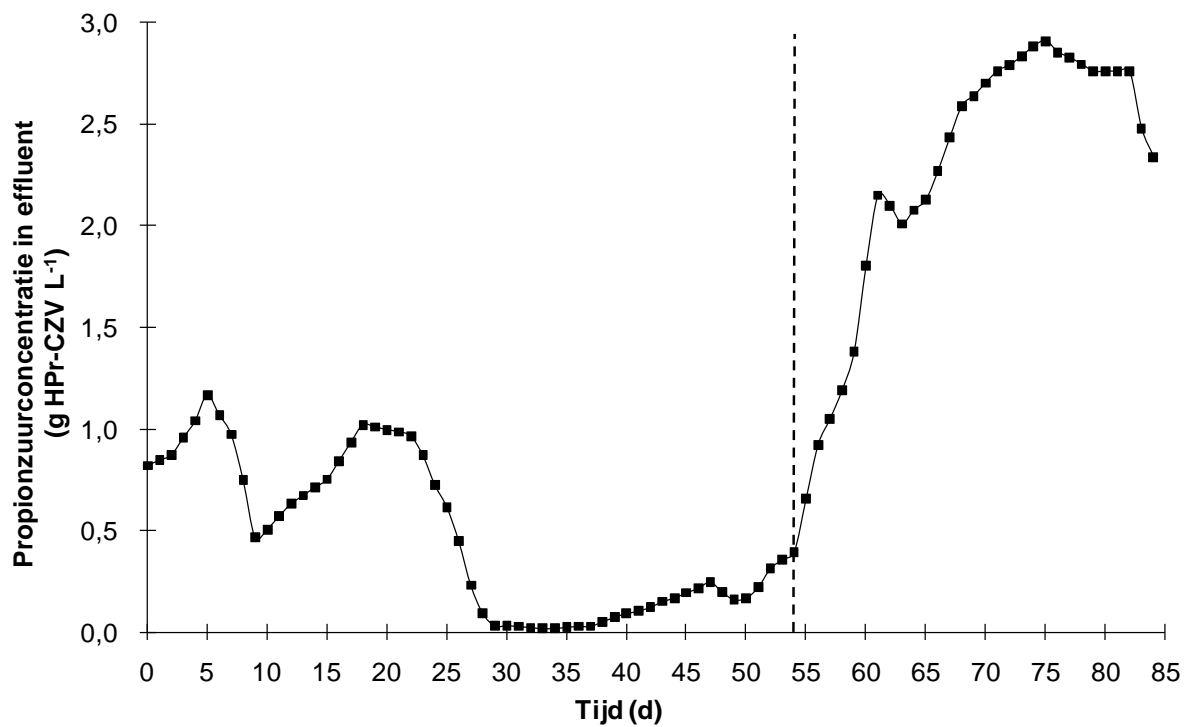
Figuur 8: Organische volumetrische belasting (■) en CZV verwijderingssnelheid (o) voor de thermofiele controlereactor CTR A



Figuur 9: Gemeten biogasproductie (■) en theoretisch berekende biogasproductie (o) voor de thermofiele controlereactor CTR A



Figuur 10: Residuele CZVt (■) en CZVs concentratie (o) in het effluent van de thermofiele controlereactor CTR A



Figuur 11: Propionzuurconcentratie in het effluent van de thermofiele controlereactor CTR A

1.2 CTR B: Thermofiele behandelingsreactor met stijgende OVB

De thermofiele behandelingsreactor CTR B kreeg een stijgende OVB toegediend om de maximale OVB te bepalen. In Figuur 12 tot en met Figuur 15 zijn de resultaten terug te vinden van CTR B in termen van organische volumetrische belasting, CZV verwijderingssnelheid, gemeten en theoretische biogasproductie, residuele totale CZV concentraties en CZV concentraties in oplossing en propionzuurconcentratie in het effluent. Analyses van de oplosbare CZV concentratie werden pas vanaf dag 19 uitgevoerd.

Fase 1 (dag 0 - dag 57)

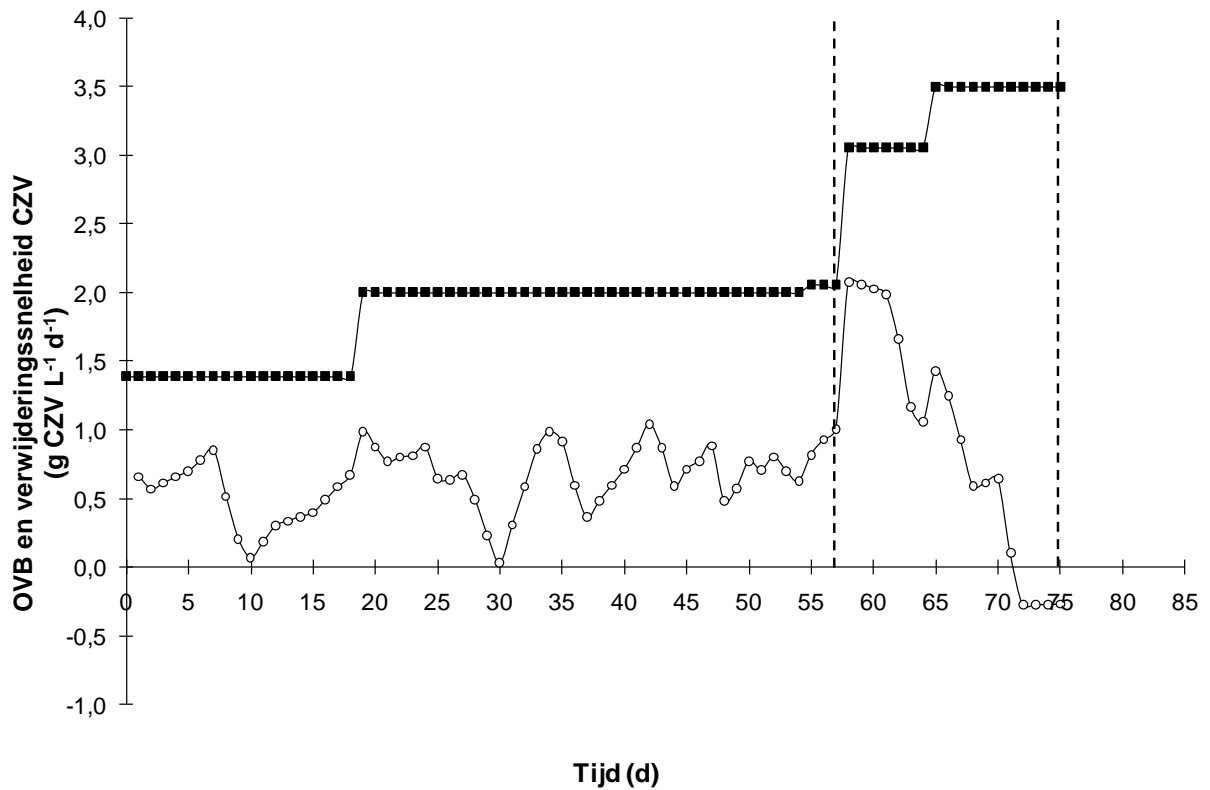
De thermofiele reactor met stijgende OVB bevond zich tot dag 57 in een eerste fase waarbij de reactor tijd kreeg om zich aan te passen aan een OVB van $2 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De bestudeerde parameters gaven aan dat de reactor goed functioneerde in deze periode. De biogasproductie nam na een maand toe tot $1,5 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, meer dan 100% van de theoretisch verwachte biogasproductie. De CZV verwijderingssnelheid schommelde rond $0,75 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De totale CZV concentratie in het effluent was ongeveer 25 g CZV L^{-1} , de oplosbare CZV concentratie 5 g CZV L^{-1} . Initieel was de propionzuurconcentratie ongeveer $0,75 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$, wat nog daalde tot $0,4 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$. De propionzuurconcentratie steeg geleidelijk vanaf dag 50, maar tot dag 57 werd de grenswaarde van $2 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ niet overschreden.

Fase 2 (dag 58 - 75)

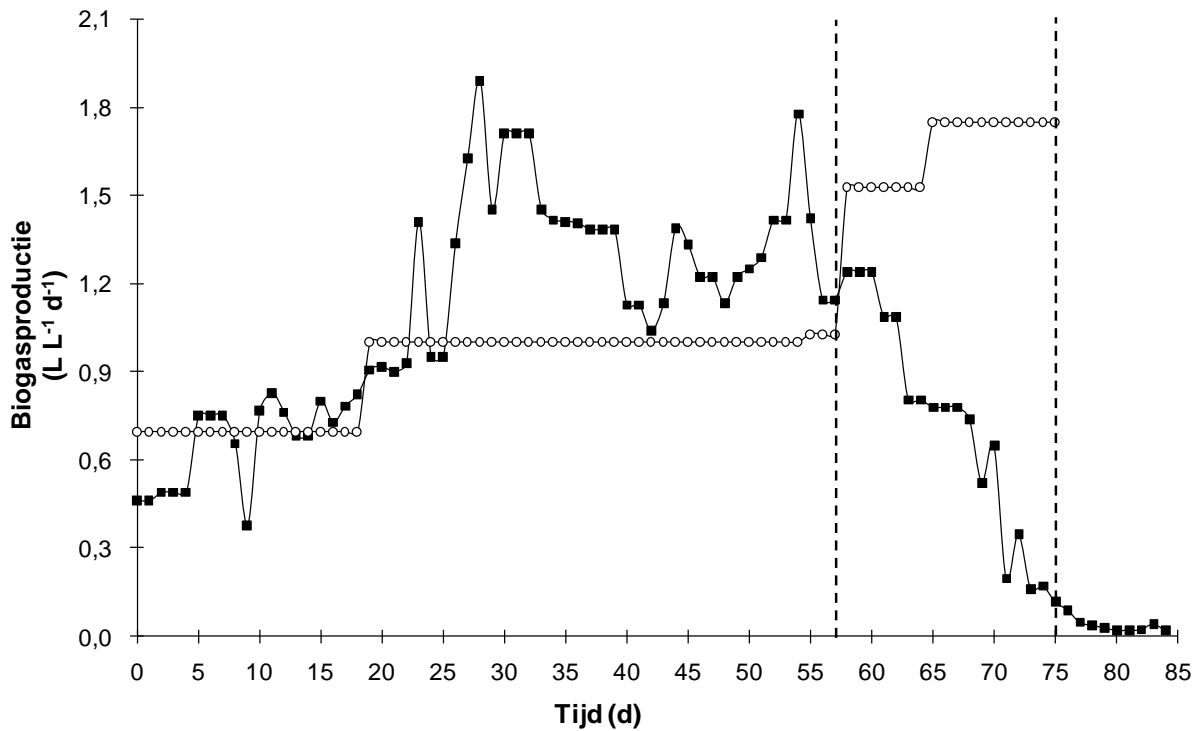
De OVB-verhoging op dag 58 van $2,1 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ naar $3,1 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ leidde tot falen van de reactor. De verhoging van OVB naar $3,5 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, veroorzaakt door variatie in de voeding door experimentele problemen, versterkte dit effect. De gemeten biogasproductie daalde tot $0,2 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en er was een sterke accumulatie van CZV tot $68 \text{ g totale CZV L}^{-1}$ en $33 \text{ g oplosbare CZV L}^{-1}$. De propionzuurconcentratie steeg tot $3,7 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$, wat bevestigde dat deze reactor verziekt was.

Fase 3 (dag 76 - 84)

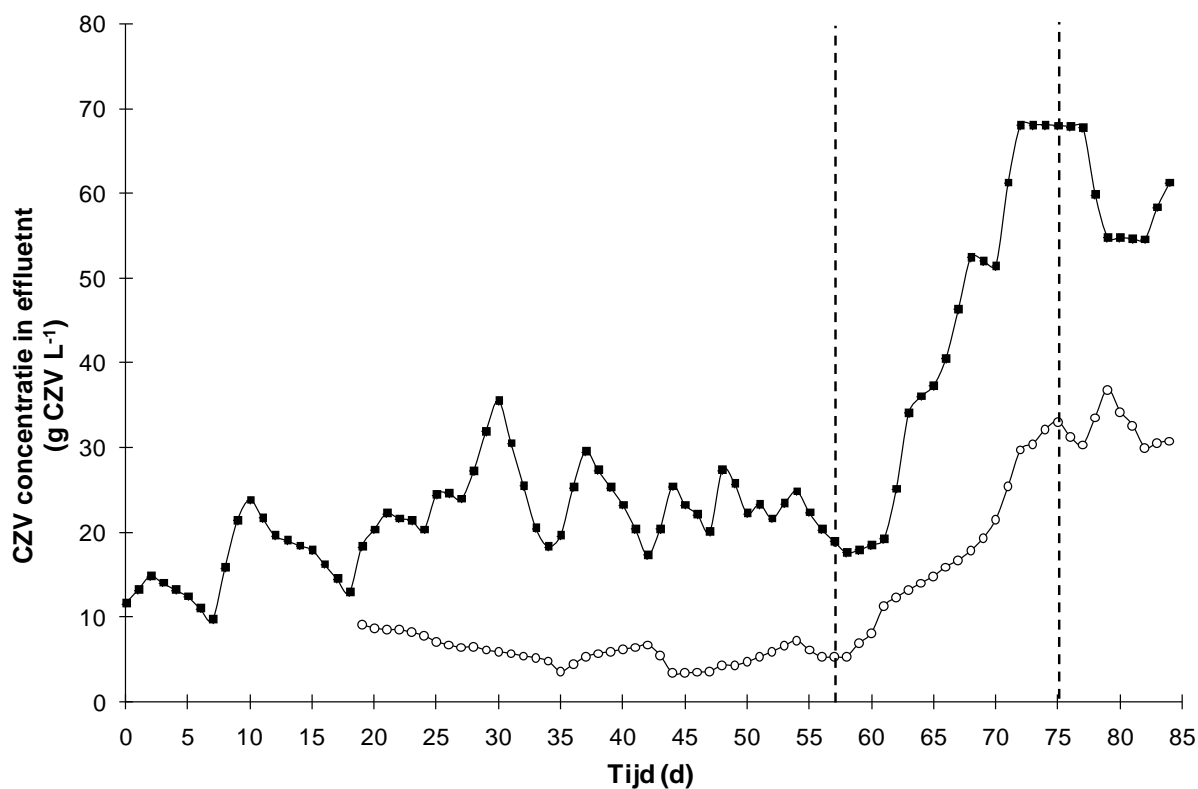
Het voeden van deze reactor werd gestopt vanaf dag 76. De CZV concentraties namen in beperkte mate af tot $55 \text{ g totale CZV L}^{-1}$ en $30 \text{ g oplosbare CZV L}^{-1}$. De propionzuurconcentratie daalde tot $2,7 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$, maar de gemeten biogasproductie daalde tot $0 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, wat aangaf dat de reactor in deze periode niet herstelde. Deze reactor werd beëindigd op dag 84.



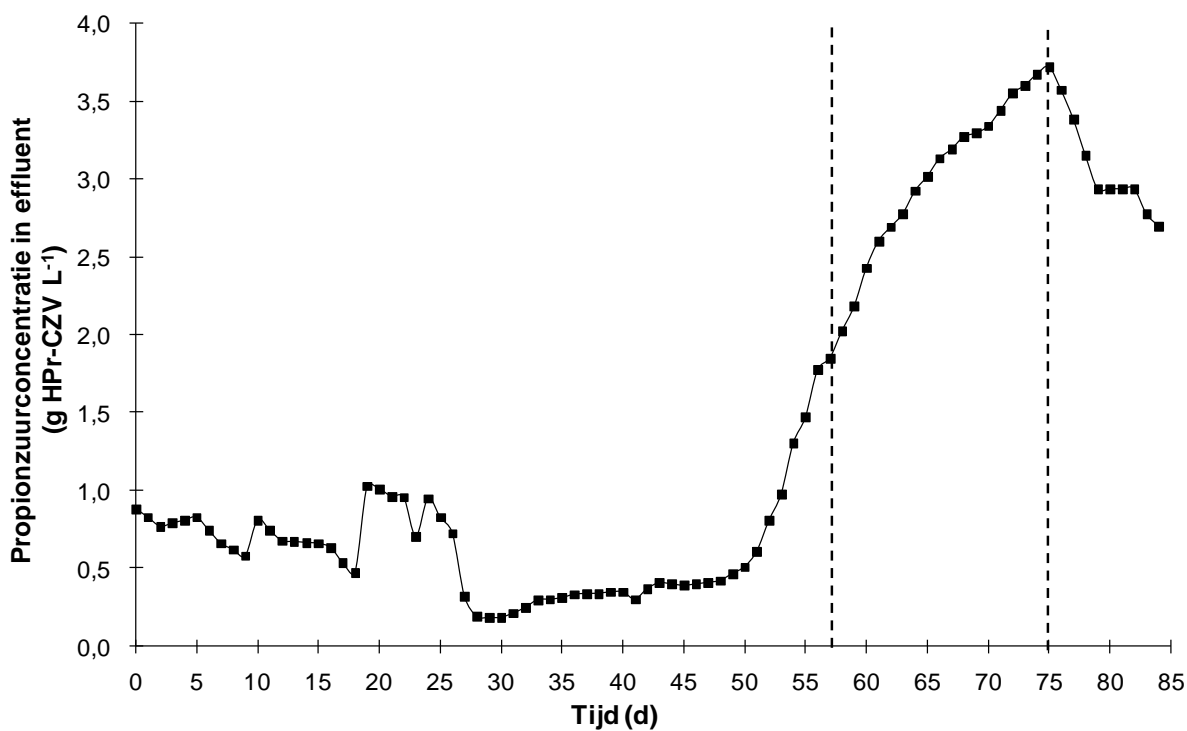
Figuur 12: Organische volumetrische belasting (■) en CZV verwijderingssnelheid (o) voor de thermofiele behandlungsreactor CTR B



Figuur 13: Gemeten biogasproductie (■) en theoretisch berekende biogasproductie (o) voor de thermofiele behandlungsreactor CTR B



Figuur 14: Residuele CZVt (■) en CZVs concentratie (o) in het effluent van de thermofiele behandelingsreactor CTR B



Figuur 15: Propionzuurconcentratie in het effluent van de thermofiele behandelingsreactor CTR B

1.3 CTR C: Mesofiele controlereactor, constante OVB van ongeveer 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹

De mesofiele controlereactor CTR C werd belast met een zo constant mogelijke OVB van 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Figuur 16 tot en met Figuur 19 geven de resultaten van CTR C weer met behulp van de volgende parameters: organische volumetrische belasting, CZV verwijderingssnelheid, gemeten en theoretische biogasproductie, residuele totale CZV concentraties en CZV concentraties in oplossing en propionzuurconcentratie in het effluent. Analyses van de totale CZV concentratie werden pas vanaf dag 62 uitgevoerd.

Fase 1 (dag 0 - dag 36)

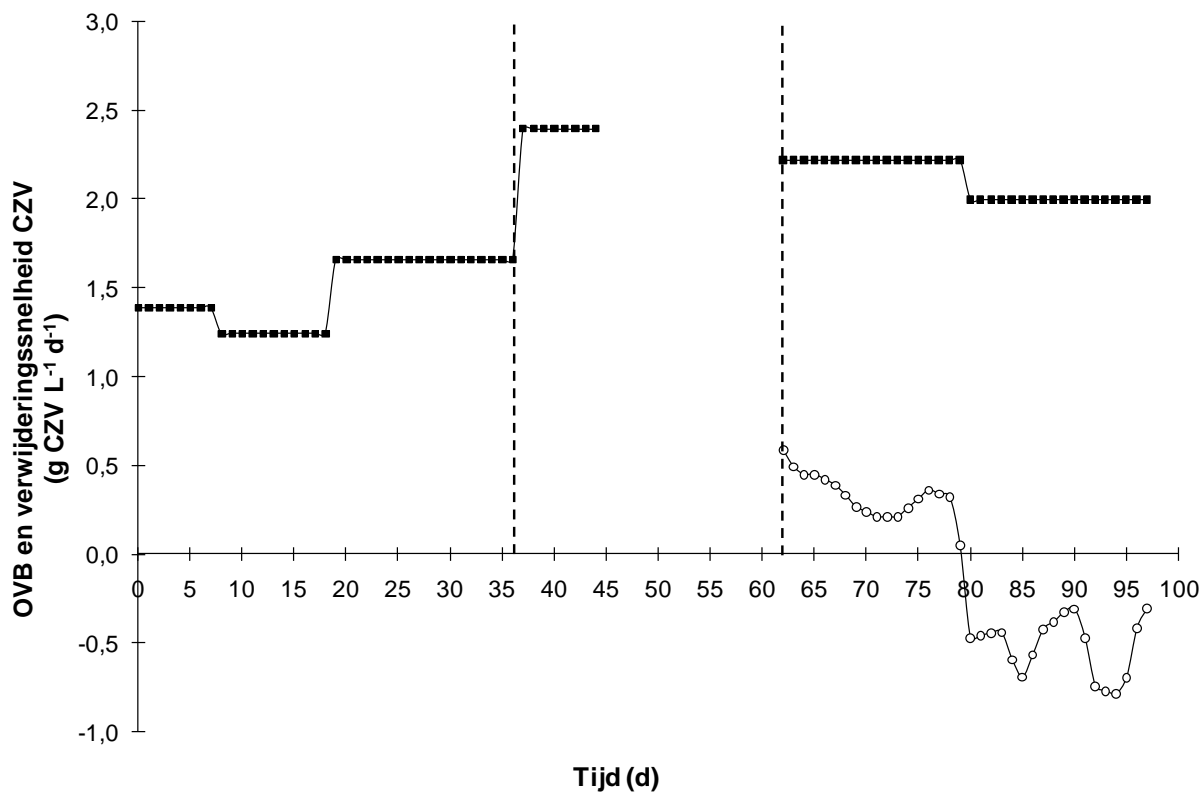
De opstartperiode van de mesofiele controlereactor liep tot dag 36 waarbij de OVB stapsgewijs werd verhoogd tot 1,7 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De parameters van deze reactor waren stabiel in deze opstartperiode. De gemeten biogasproductie was 0,7 L L⁻¹ d⁻¹, 85% van de theoretische berekende biogasproductie, de oplosbare CZV concentratie in het effluent was 4 g CZV L⁻¹ en na een initiële stijging tot 3,5 g HPr-CZV L⁻¹ daalde de propionzuurconcentratie tot 1 g HPr-CZV L⁻¹.

Fase 2 (dag 37 - dag 61)

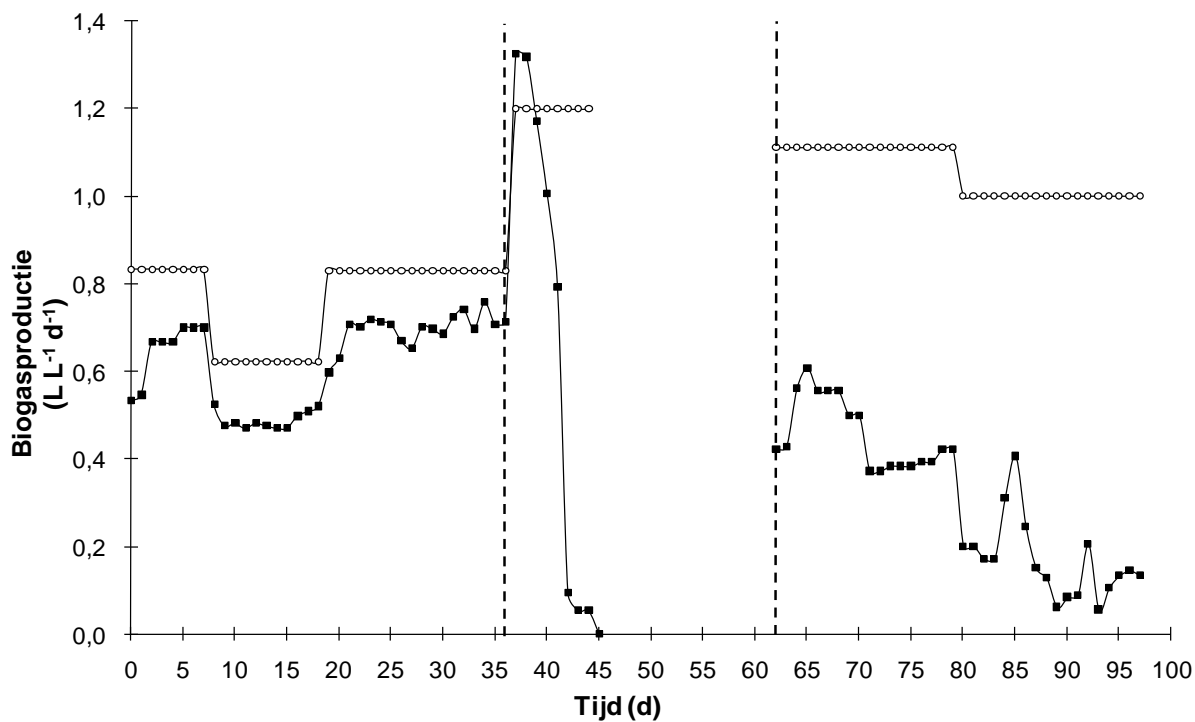
Wegens experimentele variatie werd de OVB op dag 37 verhoogd tot 2,4 g CZV L⁻¹ d⁻¹ in plaats van de controlewaarde van 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Als gevolg hiervan stopte de biogasproductie volledig en steeg de oplosbare CZV concentratie in het effluent tot 10 g CZV L⁻¹. Van dag 45 tot dag 61 werd de reactor niet gevoed om spontaan herstel te laten optreden. Op dag 58 werd 7 L van de gemengde vloeistof van CTR C aangelengd met 7 L mesofiel slib en 4 L water.

Fase 3 (dag 62 - dag 97)

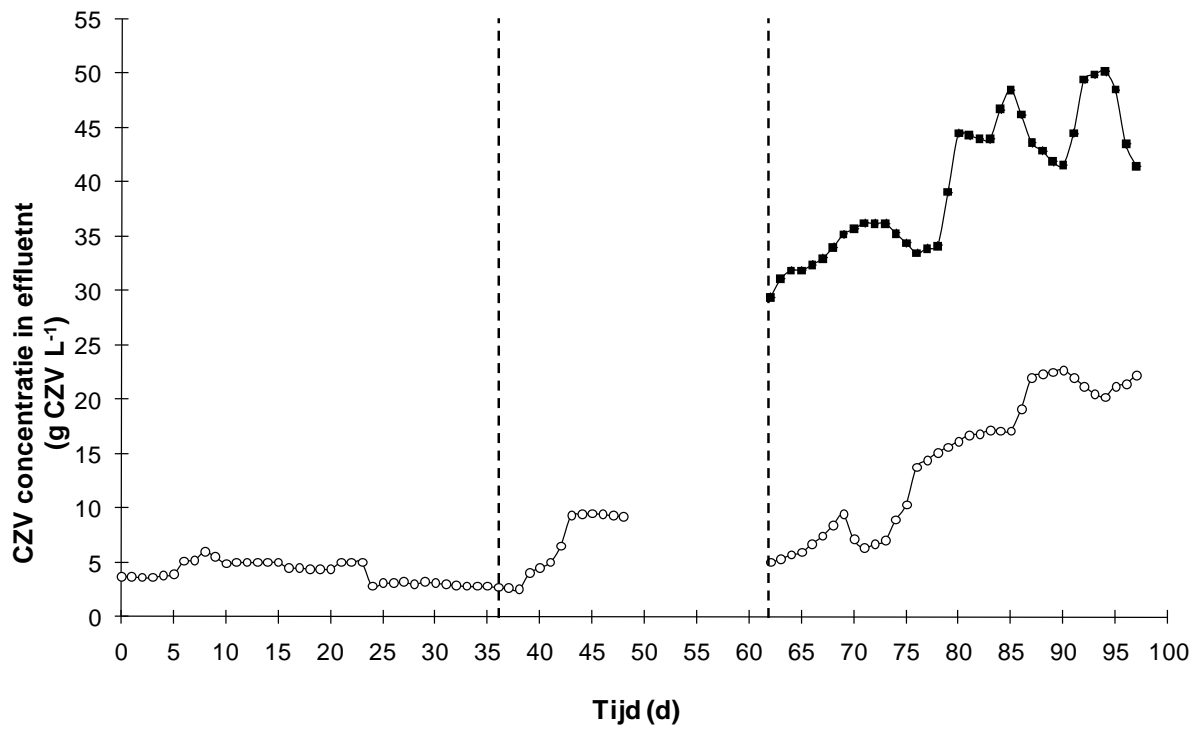
Vanaf dag 62 werd de reactor terug gevoed met een OVB van 2,2 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De waargenomen biogasproductie was 0,4 L L⁻¹ d⁻¹, wat ongeveer 40% was van de theoretisch verwachte productie. De CZV concentraties en propionzuurconcentraties namen echter geleidelijk aan toe in het eerste deel van deze periode tot dag 80. Het totale CZV gehalte nam toe van 30 g CZV L⁻¹ tot 35 g CZV L⁻¹, de oplosbare CZV concentratie steeg van 5 g CZV L⁻¹ tot 15 g CZV L⁻¹ en de propionzuurconcentratie kende een sterke stijging van 2 g HPr-CZV L⁻¹ tot 4,5 g HPr-CZV L⁻¹. In een poging om de reactor te laten herstellen, werd op dag 80 de OVB verlaagd tot 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹, maar dit leverde geen verbeteringen in de parameters op. De biogasproductie daalde integendeel zelfs tot 0,2 L L⁻¹ d⁻¹ en accumulatie van CZV werd waargenomen, aangezien de verwijderingssnelheid van CZV in het effluent afnam tot -0,5 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De totale CZV concentratie in het effluent steeg tot 45 g CZV L⁻¹, de oplosbare CZV concentratie nam toe tot 20 g CZV L⁻¹ en de propionzuurconcentratie bereikte zeer hoge waarden van 6,5 g HPr-CZV L⁻¹. Deze reactor werd beëindigd op dag 97.



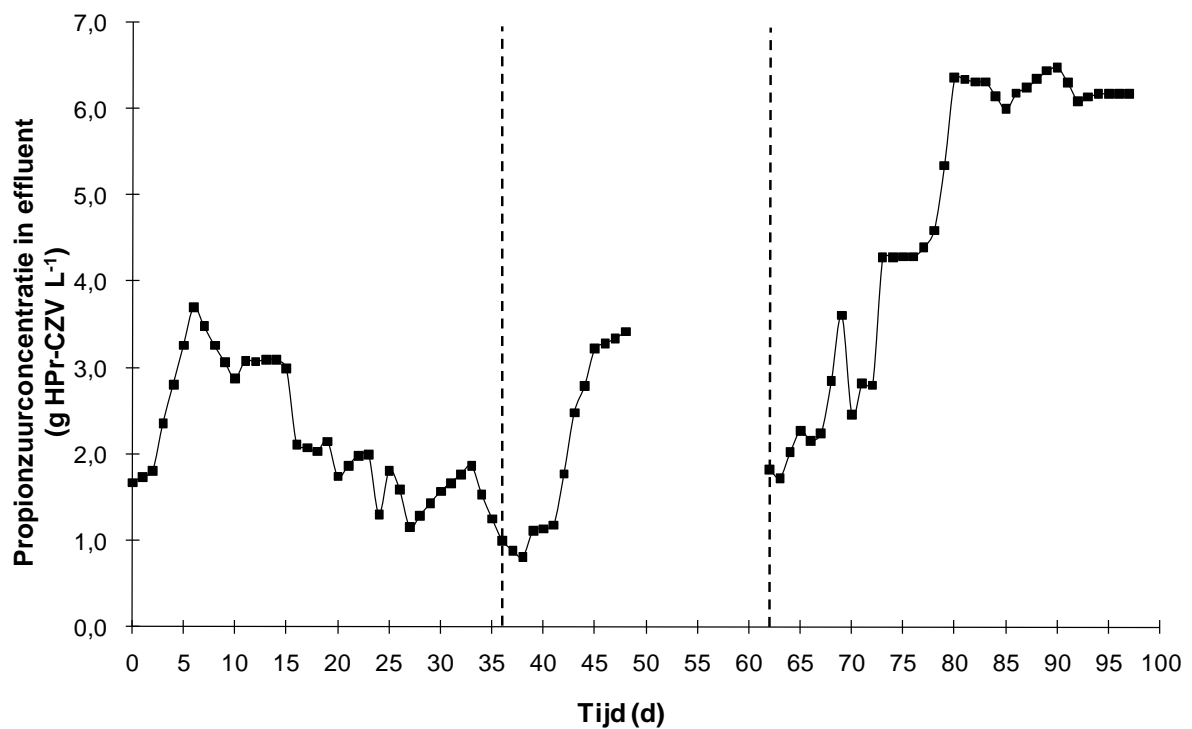
Figuur 16: Organische volumetrische belasting (■) en CZV verwijderingssnelheid (o) voor de mesofiele controlereactor CTR C



Figuur 17: Gemeten biogasproductie (■) en theoretisch berekende biogasproductie (o) voor de mesofiele controlereactor CTR C



Figuur 18: Residuele CZVt (■) en CZVs concentratie (o) in het effluent van de mesofiele controlereactor CTR C



Figuur 19: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele controlereactor CTR C

1.4 CTR D: Mesofiele behandelingsreactor met stijgende OVB

CTR D was de mesofiele behandelingsreactor die belast werd met een stijgende OVB om de maximaal mogelijke belasting te bepalen. Figuur 20 tot en met Figuur 23 geven de resultaten van CTR D weer met behulp van de volgende parameters: organische volumetrische belasting, CZV verwijderingssnelheid, gemeten en theoretische biogasproductie, residuele totale CZV concentraties en CZV concentraties in oplossing en propionzuurconcentratie in het effluent. Analyses van de totale CZV concentratie werden pas vanaf dag 62 uitgevoerd.

Fase 1 (dag 0 - dag 36) en Fase 2 (dag 37 - dag 61)

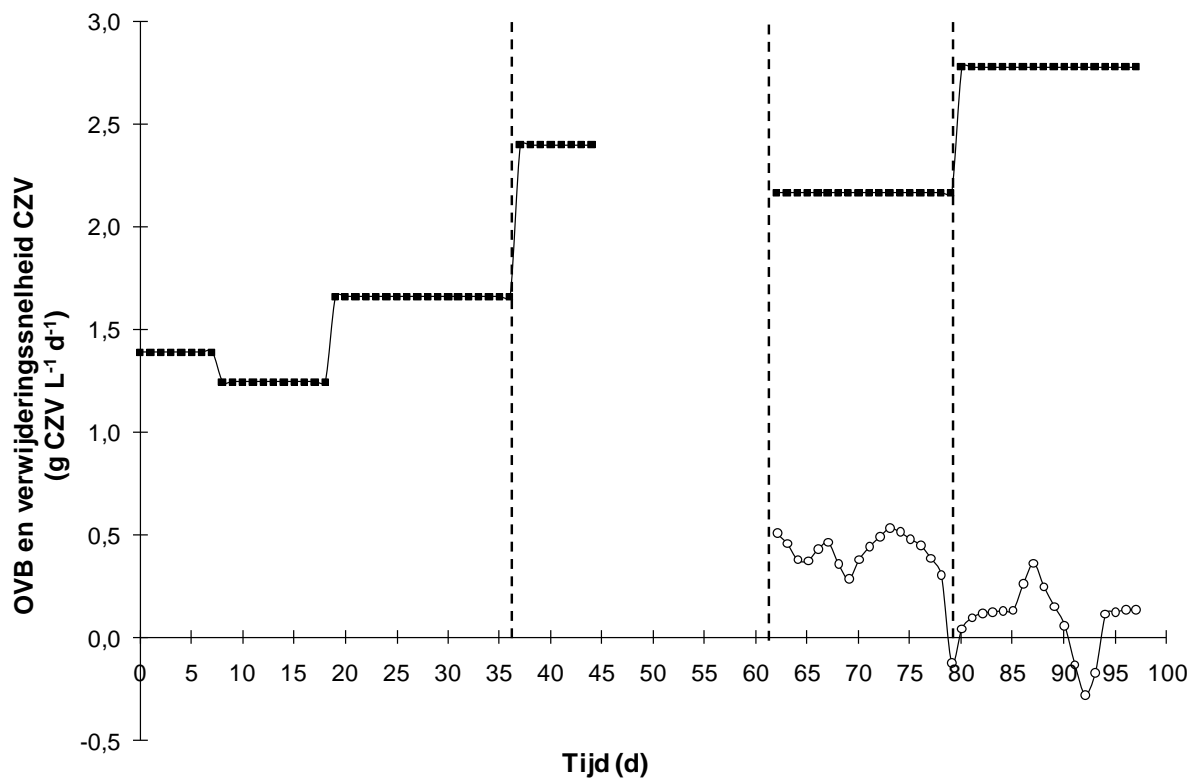
De gegevens van dag 1 tot 58 zijn voor CTR C en D dezelfde aangezien pas op dag 58 de oorspronkelijke mesofiele reactor in twee verschillende reactoren werd gesplitst. Op dag 58 werd CTR D opgestart door 7 L van de gemengde vloeistof van CTR C aan te lengen met 7 L mesofiel slib en 4 L water. De resultaten van de eerste en tweede fase zijn terug te vinden in paragraaf 1.4 van dit hoofdstuk.

Fase 3 (dag 62 - dag 79)

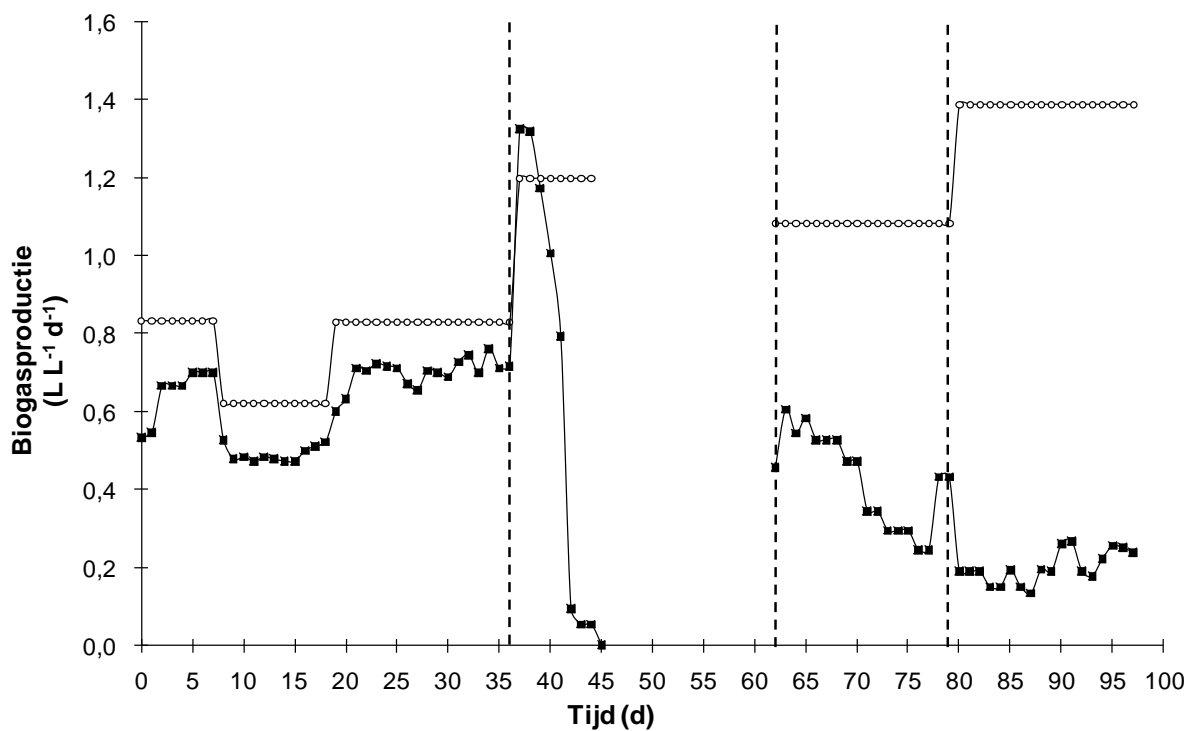
Vanaf dag 62 werd de reactor gevoed met een OVB van $2,2 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De gemeten biogasproductie daalde van $0,5 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ tot $0,3 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en de CZV verwijderingssnelheid varieerde rond $0,5 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De totale CZV concentratie in het effluent was ongeveer 30 g CZV L^{-1} , de oplosbare CZV concentratie was 10 g CZV L^{-1} . De propionzuurconcentratie steeg van $2 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ tot $5 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$, wat een indicatie gaf dat de reactor aan het falen was.

Fase 4 (dag 80 - dag 97)

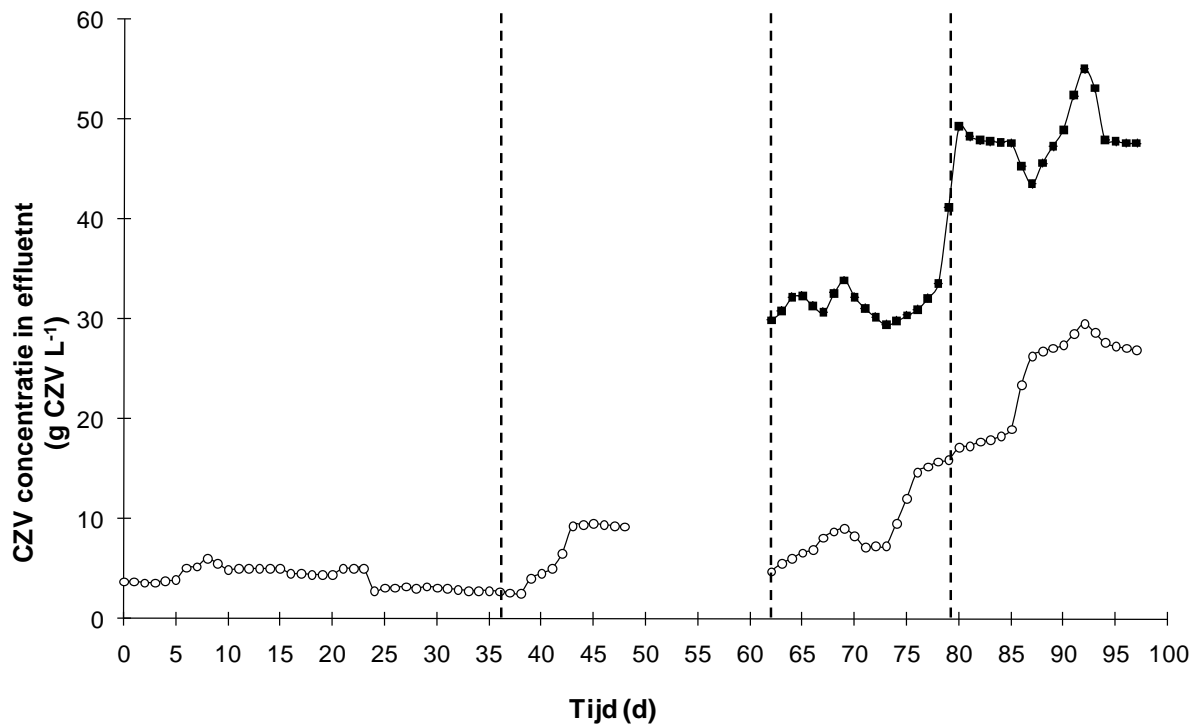
Deze trends uit de vorige fase werden nog sterker waargenomen na een verhoging van OVB naar $2,8 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ op dag 80 wegens experimentele variatie bij het maken van de voeding. De biogasproductie daalde tot $0,2 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De andere parameters stegen, maar bereikten vanaf dag 85 min of meer constante waarden. De totale CZV concentratie in het effluent bereikte waarden van 50 g CZV L^{-1} , de oplosbare CZV concentratie nam toe tot 28 g CZV L^{-1} . De propionzuurconcentratie steeg tot $7 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$. Deze reactor werd stopgezet op dag 97.



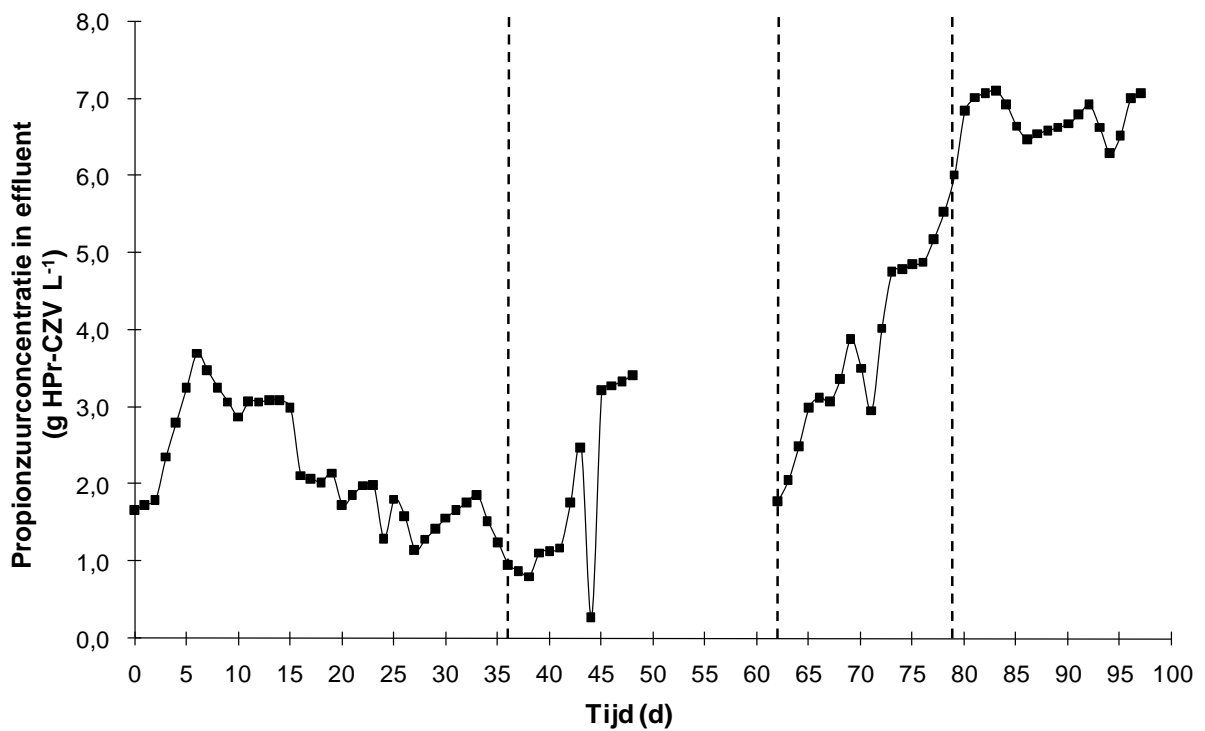
Figuur 20: Organische volumetrische belasting (■) en CZV verwijderingssnelheid (o) voor de mesofiele behandelingsreactor CTR D



Figuur 21: Gemeten biogasproductie (■) en theoretisch berekende biogasproductie (o) voor de mesofiele behandelingsreactor CTR D



Figuur 22: Residuele totale CZV concentratie (■) en oplosbare CZV concentratie (o) in het effluent van de mesofiele behandlingsreactor CTR D



Figuur 23: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele behandlingsreactor CTR D

1.5 Totale VVZ- en azijnzuurconcentratie

In de CTR-reactoren werd ook de concentratie aan totale vrije vetzuren en azijnzuur opgevolgd. De waarden weergegeven in Tabel 6 en Tabel 7 zijn berekend op basis van de concentraties van zeven opeenvolgende dagen. De thermofiele controlereactor CTR A had een totale VVZ-concentratie tussen 1,1 en 16,0 g L⁻¹ en een azijnzuurconcentratie tussen 0,6 en 7,0 g L⁻¹. Voor CTR B, de thermofiele behandelingsreactor, viel de totale VVZ-concentratie in het bereik van 1,1 tot 21,7 g L⁻¹, terwijl de azijnzuurconcentratie tussen 0,6 en 12,7 g L⁻¹ lag.

Tabel 6: Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties voor thermofiele CTR-reactoren (g L⁻¹) (n=7)

Dag	CTR A: Thermofiel, controle		CTR B: Thermofiel, stijgende OVB	
	Totale VVZ	Azijnzuur	Totale VVZ	Azijnzuur
1-7	3,0 ± 0,5	2,1 ± 0,6	3,0 ± 0,3	2,2 ± 0,2
8-14	1,2 ± 0,4	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,3
15-21	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1
21-28	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,2
49-55	1,2 ± 0,5	0,6 ± 0,4	2,9 ± 1,7	1,8 ± 1,3
56-63	6,8 ± 3,0	4,8 ± 2,0	7,5 ± 3,0	4,8 ± 1,9
68-75	16,0 ± 0,9	7,0 ± 0,7	21,7 ± 1,6	12,7 ± 1,6

De totale VVZ-concentratie van de mesofiele controlereactor CTR C varieerde van 2,0 tot 19,3 g L⁻¹ en de azijnzuurconcentratie van 0,9 tot 9,7 g L⁻¹. De mesofiele behandelingsreactor CTR D had een VVZ-concentratie binnen het bereik van 2,0 tot 23,5 g L⁻¹ en de azijnzuurconcentratie varieerde tussen 0,9 en 11,9 g L⁻¹.

Tabel 7: Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties voor mesofiele CTR-reactoren (g L⁻¹) (n=7)

Dag	CTR C: Mesofiel, controle		CTR D: Mesofiel, stijgende OVB	
	Totale VVZ	Azijnzuur	Totale VVZ	Azijnzuur
1-7	3,5 ± 1,0	1,4 ± 0,4	3,5 ± 1,0	1,4 ± 0,4
11-17	3,2 ± 0,6	1,0 ± 0,2	3,2 ± 0,6	1,0 ± 0,2
21-27	2,4 ± 0,5	1,0 ± 0,2	2,4 ± 0,5	1,0 ± 0,2
31-37	2,0 ± 0,4	0,9 ± 0,2	2,0 ± 0,4	0,9 ± 0,2
41-47	4,9 ± 1,8	2,5 ± 1,0	4,9 ± 1,8	2,5 ± 1,0
61-67	4,3 ± 0,9	2,1 ± 0,4	5,3 ± 1,4	2,5 ± 0,7
71-77	9,3 ± 4,2	4,8 ± 2,5	10,6 ± 2,3	6,1 ± 1,8
82-87	19,3 ± 2,5	9,7 ± 1,7	23,5 ± 0,5	11,9 ± 0,6
92-97	18,0 ± 0,9	8,8 ± 0,7	22,6 ± 2,1	10,9 ± 1,3

1.6 Totale alkaliniteit

In de thermofiele en mesofiele CTR-reactoren werd op regelmatige basis de alkaliniteit bepaald. De resultaten daarvan zijn weergegeven in Tabel 8 en Tabel 9. De totale alkaliniteit in de thermofiele reactoren lag tussen $4,4 \text{ g L}^{-1}$ en $8,4 \text{ g L}^{-1}$. In de mesofiele reactoren varieerde deze waarde van $3,2 \text{ g L}^{-1}$ tot $8,8 \text{ g L}^{-1}$.

Tabel 8: Totale alkaliniteit in thermofiele reactoren CTR A en CTR B ($\text{g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)

Dag	CTR A	CTR B
23	5,9	5,5
34	5,0	4,6
58	4,4	4,8
65	4,7	4,7
70	5,8	7,2
77	8,0	8,4

Tabel 9: Totale alkaliniteit in mesofiele reactoren CTR C en CTR D ($\text{g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)

Dag	CTR C	CTR D
7	5,2	5,2
38	3,2	3,2
48	4,6	4,6
69	7,2	7,2
73	8,0	7,1
80	7,1	7,1
87	8,8	8,8
97	8,7	7,6

1.7 Ammoniumconcentratie

De ammoniumconcentratie in de gemengde vloeistof van de thermofiele en mesofiele reactoren werd respectievelijk op dag 75 en dag 90 bepaald op het einde van de uitgevoerde experimenten. Zoals in Tabel 10 weergegeven is, hadden de thermofiele CTR-reactoren een ammoniumconcentratie van $1,1 \text{ g NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$. De concentratie in de mesofiele reactoren was $0,65 \text{ g NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$.

Tabel 10: Ammoniumconcentraties CTR-reactoren ($\text{g NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$)

Thermofiel, controle (CTR A)	1,12
Thermofiel, stijgende OVB (CTR B)	1,11
Mesofiel, controle (CTR C)	0,62
Mesofiel, stijgende OVB (CTR D)	0,71

1.8 DS en VS concentratie

Wekelijks werden de DS en VS concentraties van de reactoren opgevolgd. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 11 en Tabel 12.

De thermofiele controlereactor CTR A had een DS concentratie tussen 5 en 20 g L⁻¹ en een VS concentratie tussen 3 en 15 g L⁻¹. Voor CTR B, de thermofiele behandelingsreactor, viel de DS concentratie in het bereik van 12 tot 36 g L⁻¹, terwijl de VS concentratie tussen 8 en 29 g L⁻¹ lag.

Tabel 11: DS en VS concentraties voor thermofiele CTR-reactoren (g L⁻¹)

Dag	CTR A: Thermofiel, controle		CTR B: Thermofiel, stijgende OVB	
	DS	VS	DS	VS
47	5	3	12	8
54	15	9	27	20
61	20	15	13	9
68	19	13	36	29
75	12	9	23	18

De DS concentratie van de mesofiele controlereactor CTR C varieerde van 16 tot 21 g L⁻¹ en de VS concentratie van 10 tot 15 g L⁻¹. De mesofiele behandelingsreactor CTR D had een DS concentratie binnen het bereik van 19 tot 30 g L⁻¹ en de VS concentratie varieerde tussen 13 en 21 g L⁻¹.

Tabel 12: DS en VS concentraties voor mesofiele CTR-reactoren (g L⁻¹)

Dag	CTR C: Mesofiel, controle		CTR D: Mesofiel, stijgende OVB	
	DS	VS	DS	VS
62	18	10	22	13
69	21	15	30	21
76	16	11	21	14
83	18	14	25	16
90	18	12	19	13

Hoofdstuk 2 Optimalisatie door verandering in reactordesign

De bedrijfsvoering van de mesofiele reactoren C en D werd geoptimaliseerd door het installeren van mechanische mixers en door het effluent te decanteren om uitwassing van biomassa te voorkomen. De opstartcondities van CSTR C en CSTR D zijn weergegeven in paragraaf 5.1 van Deel II Materiaal en methoden.

2.1 CSTR C: Mesofiele controlereactor, constante OVB van ongeveer 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹

De mesofiele controlereactor CSTR C werd gevoed met een constante OVB van ongeveer 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De resultaten zijn terug te vinden in Figuur 24 tot en met Figuur 27 in termen van organische volumetrische belasting, CZV verwijderingssnelheid, biogasproductie, residuele totale CZV concentraties en CZV concentraties in oplossing en propionzuurconcentratie in het effluent.

Fase 1 (dag 133 - dag 154)

De OVB varieerde in de opstartfase tussen 1,5 en 1,7 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De biogasproductie was bij de opstart ongeveer 0,6 L L⁻¹ d⁻¹. De totale CZV concentratie in het effluent daalde van de initiële waarde 33 g CZV L⁻¹ naar ongeveer 20 g CZV L⁻¹. De oplosbare CZV concentratie daalde van 15 g CZV L⁻¹ naar 7 g CZV L⁻¹ en bleef vanaf dag 140 stabiel rond 7 g CZV L⁻¹. Propionzuur daalde van 3,1 g HPr-CZV L⁻¹ op dag 134 naar 2,0 g HPr-CZV L⁻¹ op dag 150. De concentraties aan totale en oplosbare CZV en propionzuur waren reeds hoog in het begin van de eerste fase, doordat deze reactor werd opgestart met verdunde gemengde vloeistof van de gefaalde reactoren uit het eerste experiment.

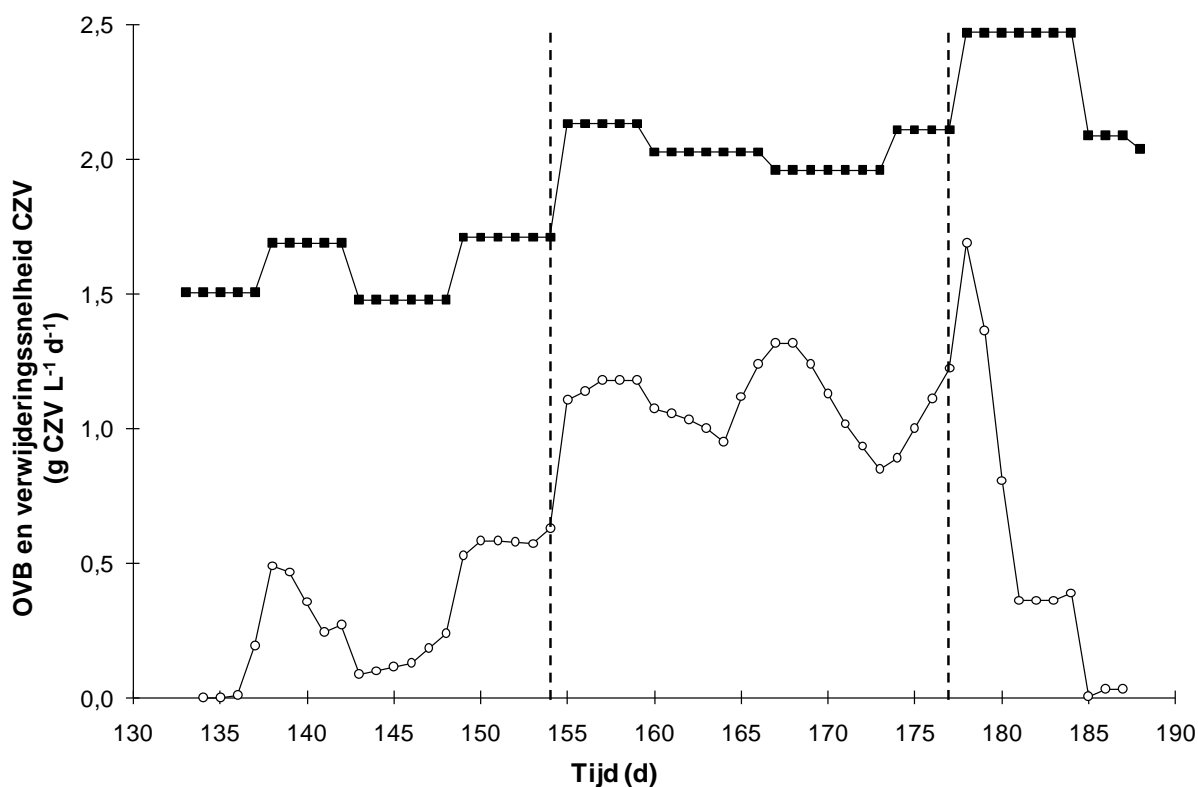
Fase 2 (dag 155 - dag 177)

Vanaf dag 155 was de controle OVB van 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹ bereikt en werd deze zo goed mogelijk constant gehouden tot dag 177. De biogasproductie steeg tot ongeveer 0,8 L L⁻¹ d⁻¹ in het begin van de tweede fase, maar vanaf dag 170 begon de biogasproductie te dalen tot 0,5 L L⁻¹ d⁻¹. De totale CZV concentratie daalde tot 12 g CZV L⁻¹ op dag 167, wat te wijten was aan het verdwijnen van initiële schuimvormingsproblemen in de reactor, waardoor er dus minder biomassa in het effluent zat. Vanaf dag 170 begon de totale CZV concentratie weer te stijgen naar 20 g CZV L⁻¹. De CZV verwijderingssnelheid varieerde rond 1 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Een lichte stijging van 7 g CZV L⁻¹ in het begin van de tweede fase naar 12 g CZV L⁻¹ op dag 178 was op te merken in de oplosbare CZV concentraties. De propionzuurconcentratie steeg vanaf dag 160 tot 2,7 g HPr-CZV L⁻¹ op het einde van de tweede fase.

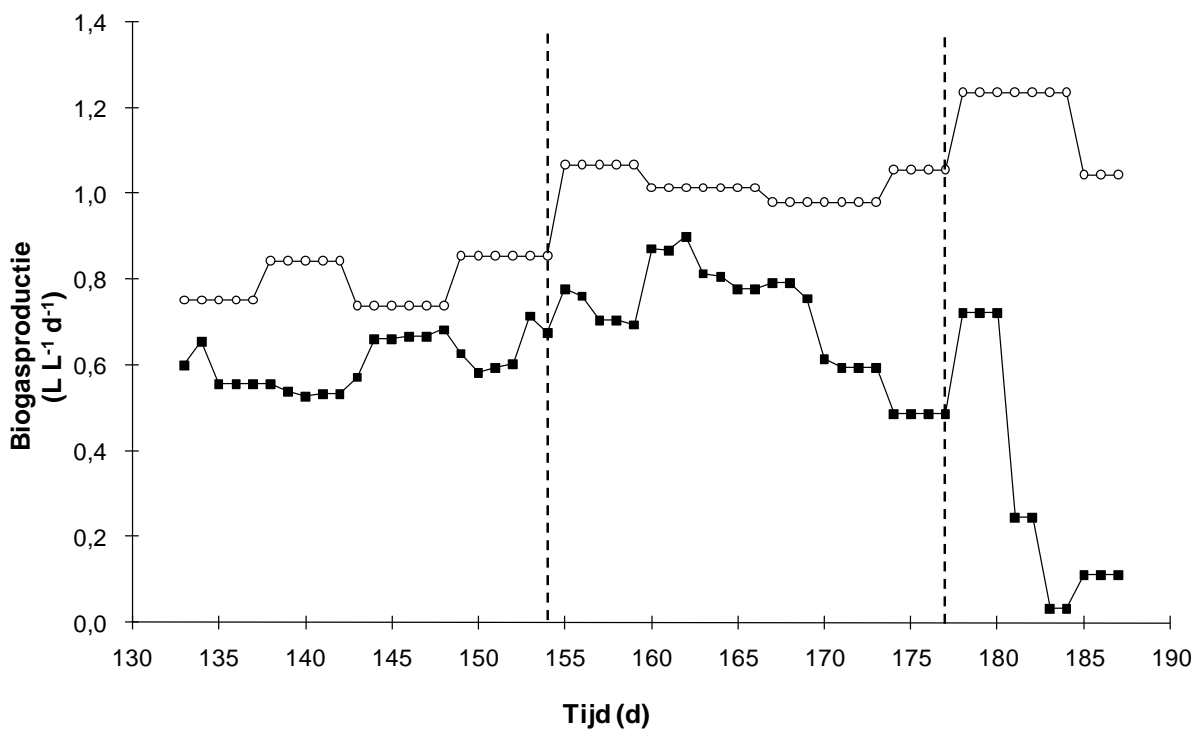
Fase 3 (dag 178 - dag 188)

De doelstelling was om de OVB constant te houden bij 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹, maar door experimentele variatie werd dit op dag 178 verhoogd tot 2,5 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Dit werd gecorrigeerd naar 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹ op dag 186, maar door grote gevoeligheid van de reactor, was het falen niet meer te voorkomen. De biogasproductie daalde vanaf dag 180 naar 0,1 L L⁻¹ d⁻¹ en de CZV verwijderingssnelheid daalde tot 0. De totale CZV concentratie kende een plotse stijging tot 38 g CZV L⁻¹. Op

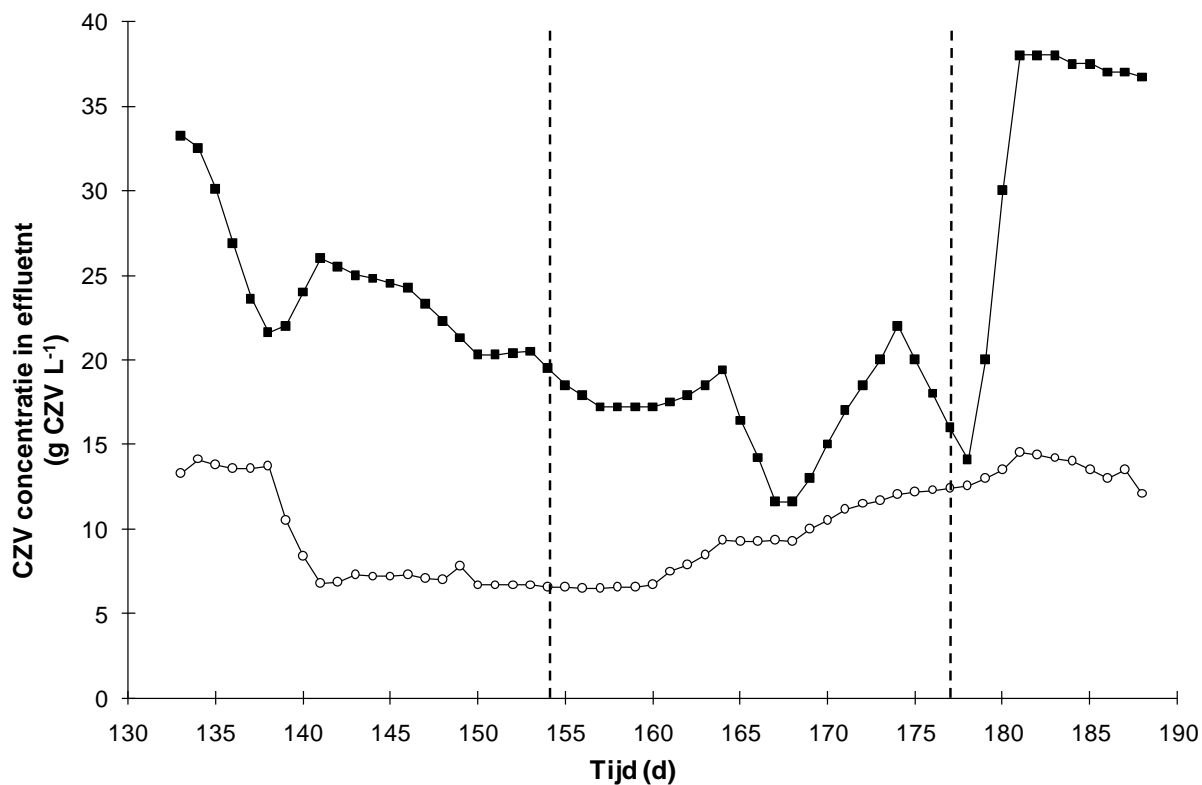
dag 181 bereikte de oplosbare CZV een maximale concentratie van 15 g CZV L^{-1} , waarna het daalde tot 12 g CZV L^{-1} op het einde van de derde fase. De concentratie aan propionzuur nam af van $3 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ tot $2,6 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$. Op dag 188 werd dit experiment beëindigd.



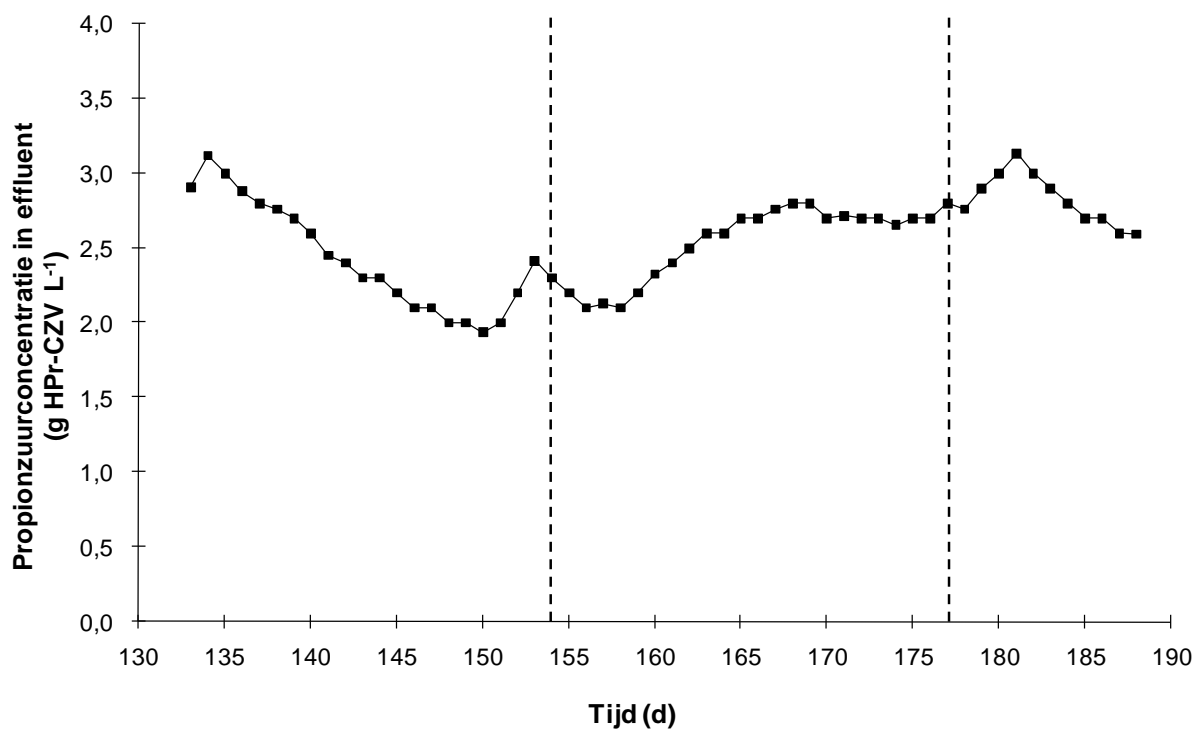
Figuur 24: Organische volumetrische belasting (■) en CZV verwijderingssnelheid (o) voor de mesofiele controlereactor CSTR C



Figuur 25: Gemeten biogasproductie (■) en theoretisch berekende biogasproductie (o) voor de mesofiele controlereactor CSTR C



Figuur 26: Residuele totale CZV concentratie (■) en oplosbare CZV concentratie (○) in het effluent van de mesofiele controlereactor CSTR C



Figuur 27: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele controlereactor CSTR C

2.2 CSTR D: Mesofiele behandelingsreactor met stijgende OVB

Om de maximaal mogelijke OVB te bepalen, werd de mesofiele behandelingsreactor CSTR D onderworpen aan een stijgende OVB. De resultaten CSTR D zijn grafisch weergegeven in Figuur 28 tot en met Figuur 31 met de evolutie in de tijd van organische volumetrische belasting, CZV verwijderingssnelheid, biogasproductie, residuele totale CZV concentraties en CZV concentraties in oplossing en propionzuurconcentratie in het effluent.

Fase 1 (dag 133 - dag 154)

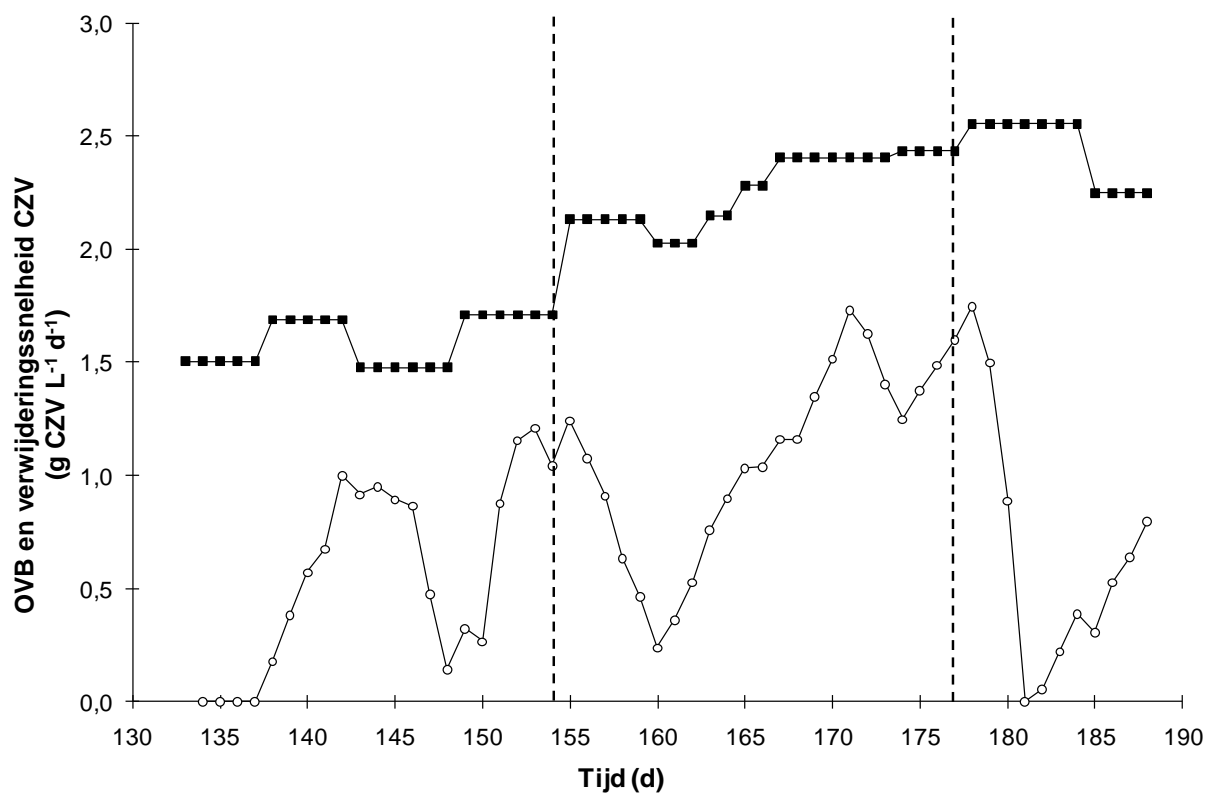
De OVB varieerde in de opstartfase tussen 1,5 en 1,7 g CZV L⁻¹ d⁻¹. De biogasproductie steeg in deze eerste fase van 0,6 L L⁻¹ d⁻¹ naar 0,7 L L⁻¹ d⁻¹. De CZV verwijderingssnelheid fluctueerde sterk aangezien deze afhankelijk waren van de CZV concentraties in het effluent. Initieel daalde de totale CZV concentratie van 35 g CZV L⁻¹ naar 10 g CZV L⁻¹ op dag 144. In de periode die volgde steeg de totale CZV concentratie tot 25 g CZV L⁻¹, maar daalde daarna weer tot 10 g CZV L⁻¹. De sterke variatie in de totale CZV concentratie kan verklaard worden door de decanterende methode van staalname, waarbij de bezinkingskarakteristieken van het slib bepalend zijn. De oplosbare CZV concentratie daalde eerst van 15 g CZV L⁻¹ naar 7 g CZV L⁻¹ en bleef vanaf dag 140 stabiel rond deze waarde, ongeveer dezelfde waarde als bij de controlereactor. Doordat deze reactor opgestart werd met gemengde vloeistof van de gefaalde reactoren uit het eerste experiment, waren de concentraties aan totale en oplosbare CZV en propionzuur al van bij aanvang van de eerste fase vrij hoog. De propionzuurconcentratie was 3,0 g HPr-CZV L⁻¹ en daalde naar 2,0 g HPr-CZV L⁻¹ tegen het einde van de eerste fase.

Fase 2 (dag 155 - 177)

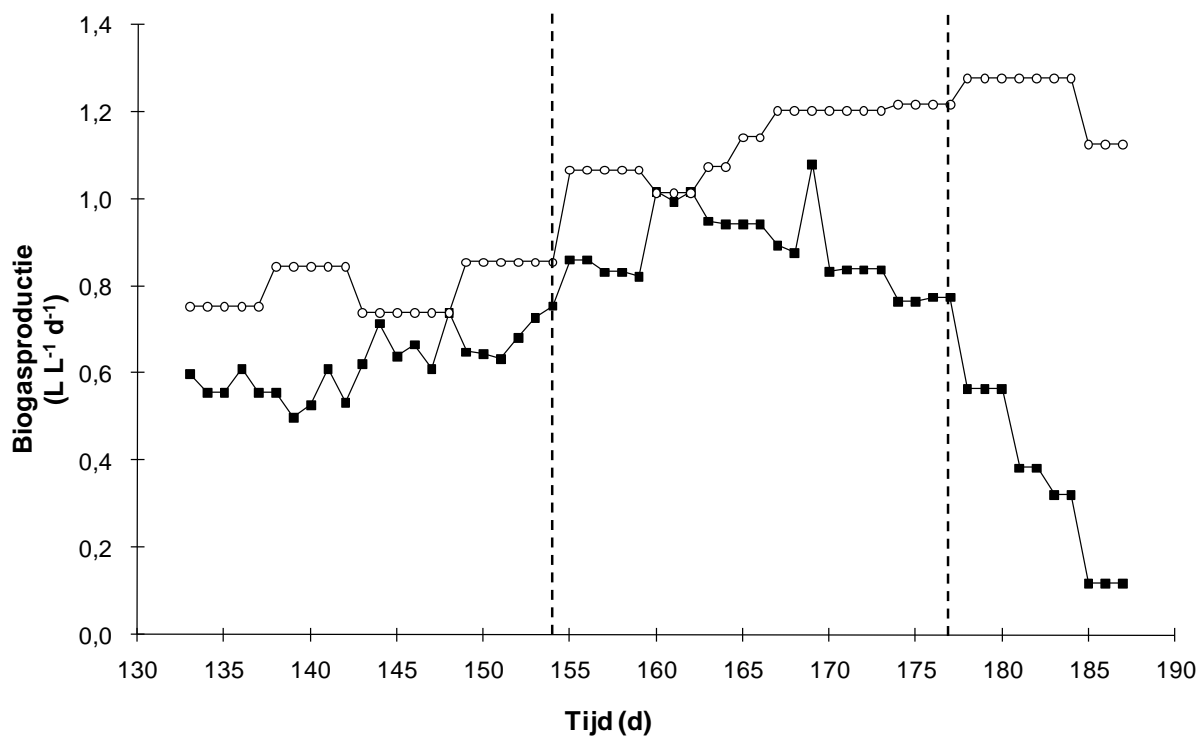
Op dag 155 werd de OVB verhoogd naar 2,1 g CZV L⁻¹ d⁻¹ en in deze tweede fase varieerde de OVB stapsgewijs naar 2,4 g CZV L⁻¹ d⁻¹ op dag 167. De biogasproductie steeg tot 1,0 L L⁻¹ d⁻¹ bij een OVB van 2,2 g CZV L⁻¹ d⁻¹ en daalde daarna tot 0,8 L L⁻¹ d⁻¹. De oplosbare CZV concentratie steeg geleidelijk van 6 g CZV L⁻¹ tot 12 g CZV L⁻¹ naar het einde van deze fase toe. Propionzuur accumuleerde tot 3 g HPr-CZV L⁻¹ op dag 177.

Fase 3 (dag 178 - 188)

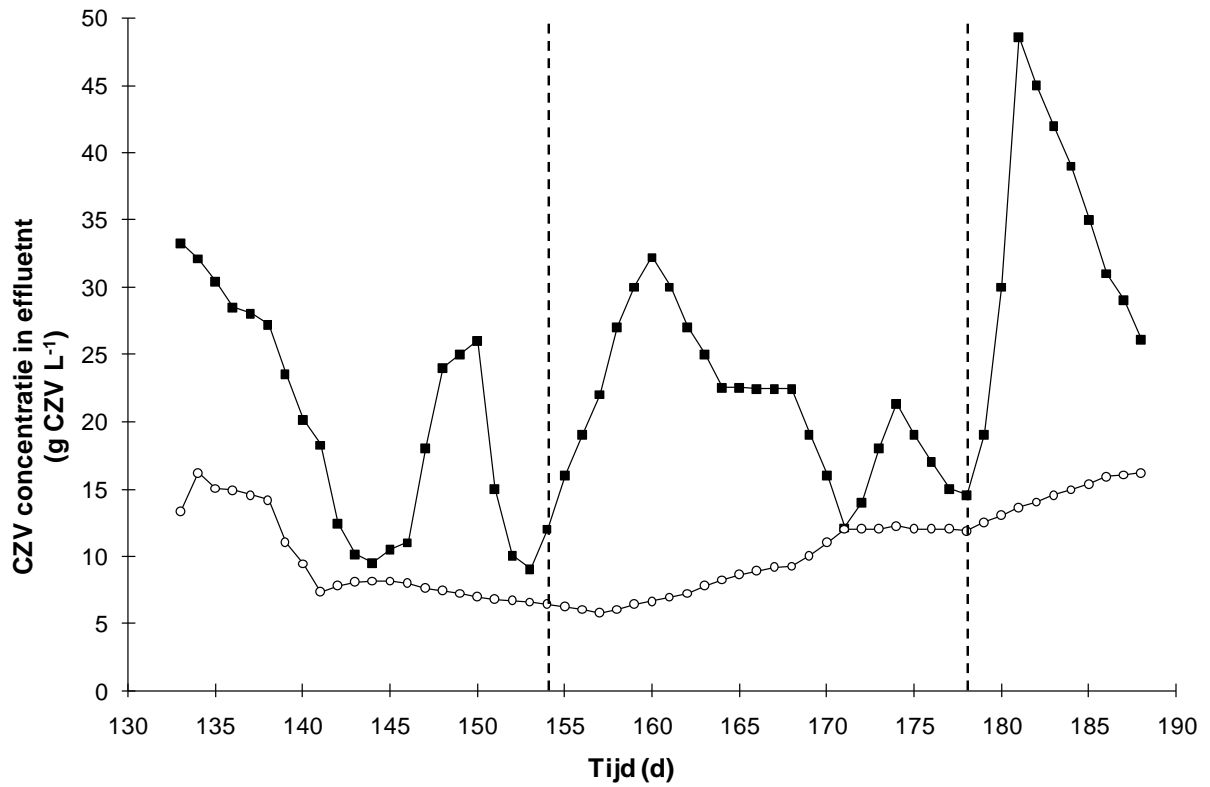
De OVB werd verhoogd naar 2,5 g CZV L⁻¹ d⁻¹ op dag 178. Dit resulteerde in het falen van de reactor, aangezien de biogasproductie daalde tot 0,1 L L⁻¹ d⁻¹. Om de reactor kans tot herstel te geven, werd de OVB op dag 183 teruggebracht naar 2,3 g CZV L⁻¹ d⁻¹, maar dit kon het falen van de reactor niet meer tegengaan. De CZV verwijderingssnelheid daalde tot 0 op dag 181 en steeg daarna tot 0,5 g CZV L⁻¹ d⁻¹ op het einde van dit experiment. De totale CZV concentratie steeg tot 50 g CZV L⁻¹ op dag 181, maar verminderde tot 26,1 g CZV L⁻¹ op dag 188. De CZV concentratie in oplossing steeg van 12 g CZV L⁻¹ naar 15 g CZV L⁻¹. De propionzuurconcentratie bereikte een maximum van 3,6 g HPr-CZV L⁻¹, maar nam daarna af tot 3,2 g HPr-CZV L⁻¹ op dag 188. De reactorparameters kenden dus een lichte verbetering naar het einde van de fase toe, maar door het uitblijven van biogasproductie werd het experiment beëindigd op dag 188.



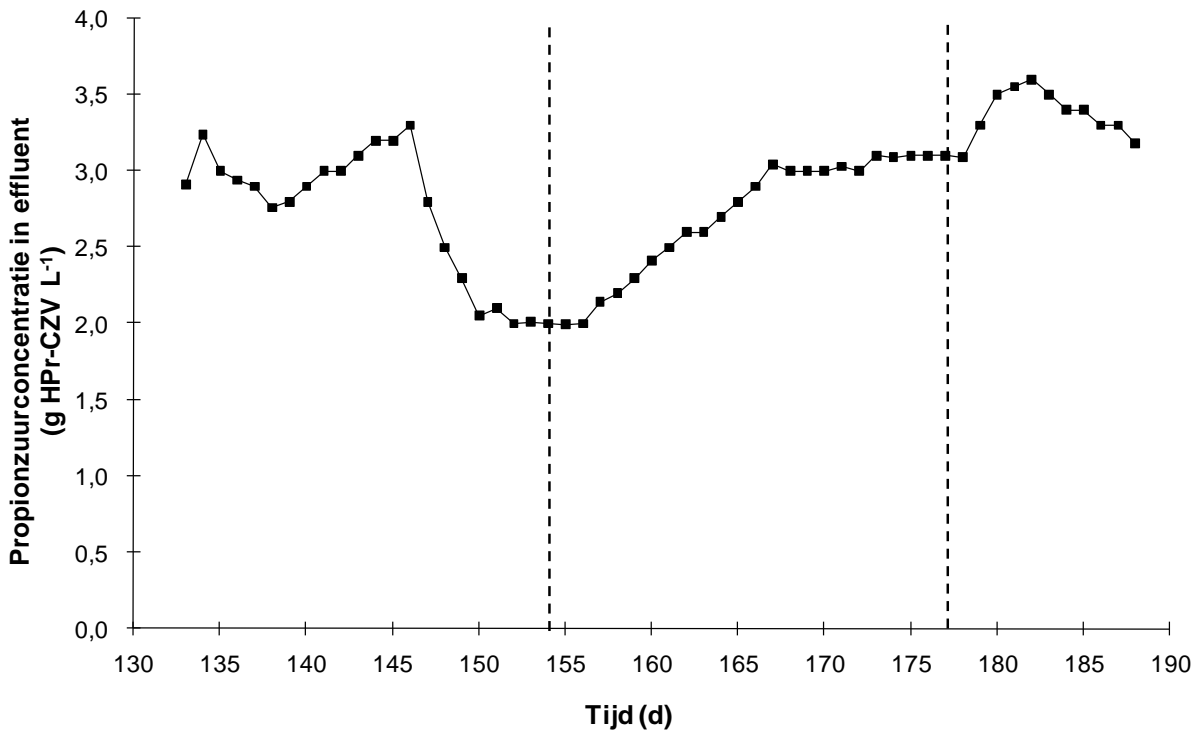
Figuur 28: Organische volumetrische belasting (■) en CZV verwijderingssnelheid (o) voor de mesofiele behandelingsreactor CSTR D



Figuur 29: Gemeten biogasproductie (■) en theoretisch berekende biogasproductie (o) voor de mesofiele behandelingsreactor CSTR D



Figuur 30: Residuele totale CZV concentratie (■) en oplosbare CZV concentratie (o) in het effluent van de mesofiele behandlingsreactor CSTR D



Figuur 31: Propionzuurconcentratie in het effluent van de mesofiele behandlingsreactor CSTR D

2.3 Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties

In de mesofiele controlereactor CSTR C varieerde de totale VVZ-concentratie tussen 3,5 en 8,9 g L⁻¹. De azijnzuurconcentratie lag tussen 1,4 en 4,7 g L⁻¹. De totale VVZ-concentratie van de mesofiele behandelingsreactor CSTR D ging van 3,3 tot 9,4 g L⁻¹, terwijl de azijnzuurconcentratie een bereik had van 1,5 tot 5,1 g L⁻¹. De gedetailleerde waarden zijn weergegeven in Tabel 13 en berekend op basis van zeven dagen (n=7).

Tabel 13: Totale VVZ- en azijnzuurconcentraties voor de mesofiele CSTR-reactoren (g L⁻¹) (n=7)

Dag	Mesofiel, controle (CSTR C)		Mesofiel, stijgende OVB (CSTR D)	
	Totale VVZ	Azijnzuur	Totale VVZ	Azijnzuur
133-139	6,7 ± 0,7	3,6 ± 0,4	7,0 ± 0,2	3,8 ± 0,3
143-149	4,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	5,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2
153-159	3,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,3 ± 0,3	1,5 ± 0,2
163-169	5,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1
173-179	6,1 ± 0,5	3,3 ± 0,4	5,8 ± 0,7	2,7 ± 0,4
182-189	8,9 ± 0,2	4,7 ± 0,1	9,4 ± 0,2	5,1 ± 0,1

2.4 Totale alkaliniteit

De totale alkaliniteit in de mesofiele reactoren CSTR C en CSTR D werd regelmatig bepaald (Tabel 14). De waarde varieerde tussen 6,0 en 11,8 g CaCO₃ L⁻¹ voor CSTR C en tussen 4,5 en 12,0 g L⁻¹ voor CSTR D.

Tabel 14: Totale alkaliniteit in mesofiele reactoren CSTR C en CSTR D (g CaCO₃ L⁻¹) (n=7)

Dag	CSTR C	CSTR D
133	6,0	4,5
141	6,1	5,9
150	7,6	7,1
157	7,6	7,6
164	7,8	7,9
171	6,4	6,6
178	6,6	6,5
188	11,8	12,0

2.5 Ripley-index

In de opstartperiode van dag 133 tot dag 150 daalde de Ripley-index van de reactoren van 0,50 en 0,44 voor respectievelijk CSTR C en CSTR D tot ongeveer 0,30. Deze waarde bleef constant tot dag 171. Vanaf dag 178 was de Ripley-index voor beide reactoren gestegen tot ongeveer 0,50. De waarden zijn opgenomen in Tabel 15.

Tabel 15: Ripley index voor de mesofiele CSTR-reactoren

Dag	CSTR C	CSTR D
133	0,50	0,44
141	0,39	0,41
150	0,31	0,32
157	0,31	0,31
164	0,32	0,28
171	0,34	0,32
178	0,42	0,42
188	0,47	0,50

2.6 DS en VS concentratie

In de mesofiele controlereactor CSTR C lag de DS concentratie tussen 25 en 38 g L⁻¹ en de VS concentratie tussen 12 en 25 g L⁻¹. De DS concentratie van de mesofiele behandelingsreactor CSTR D lag in het bereik van 24 tot 36 g L⁻¹, terwijl de VS concentratie varieerde tussen 12 en 21 g L⁻¹. De gedetailleerde waarden zijn weergegeven in Tabel 16.

Tabel 16: DS en VS waarden voor de mesofiele CSTR-reactoren (g L⁻¹)

Dag	Mesofiel, controle (CSTR C)		Mesofiel, stijgende OVB (CSTR D)	
	DS	VS	DS	VS
133	29	16	29	16
146	29	16	28	14
153	25	12	24	12
160	25	13	25	12
167	26	14	28	15
174	28	17	30	18
181	31	20	32	18
188	38	25	36	21

2.7 Anionen- en kationenconcentraties

In Tabel 17 zijn de resultaten weergegeven van de concentratiebepaling voor een aantal kationen en anionen die kunnen voorkomen in anaerobe vergisters. Voor ijzer, sulfaat en chloor waren de concentraties in beide reactoren dezelfde. Calcium, ammonium, nitraat en fosfaat waren minder aanwezig in de controlereactor in vergelijking met de behandelingsreactor. Natrium kwam in hogere concentratie voor in de controlereactor.

Tabel 17: Anionen- en kationenconcentraties in mesofiele CSTR-reactoren op dag 188 (mg L⁻¹)

	Fe	Ca ²⁺	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻ -P	SO ₄ ²⁻ -S	Na ⁺
CSTR C	0,2	2,1	940,0	n.d.*	10,6	547,1	115,6	2,7	3708
CSTR D	0,2	9,0	1089,2	n.d.	12,8	548,9	127,4	1,5	3392

*n.d. = niet gedetecteerd

Hoofdstuk 3 Microbiële analyses

3.1 Karakterisering stalen

Vanaf dag 54 werd er elk hydraulische verblijftijd een staal genomen van de gemengde vloeistof in de anaerobe reactoren uit voorgaande experimenten om de microbiële gemeenschap te onderzoeken. In Tabel 18 en Tabel 19 zijn de gemiddelde parameterwaarden weergegeven voor de zeven dagen voorafgaand aan de dag van staalname (n=7).

Tabel 18: Karakterisering van stalen uit CTR-reactoren (n=7)

Staal	Reactor + dag	OVB (g CZV L ⁻¹ d ⁻¹)	Propionzuur (g HPr-CZV L ⁻¹)	% van theor. biogasproductie
1	CTR A Dag 54	1,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	52% ± 8%
2	CTR A Dag 72	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,2	7% ± 2%
3	CTR A Dag 86	2,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	5% ± 3%
4	CTR B Dag 54	2,0 ± 0,1	0,7 ± 0,3	120% ± 15%
5	CTR B Dag 72	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1	33% ± 13%
6	CTR B Dag 86	Geen voeding	2,9 ± 0,1	1% ± 1%
7	CTR C Dag 80	2,2 ± 0,1	4,5 ± 0,4	36% ± 2%
8	CTR C Dag 97	2,0 ± 0,1	6,2 ± 0,1	12% ± 5%
9	CTR D Dag 80	2,2 ± 0,1	5,2 ± 0,5	29% ± 7%
10	CTR D Dag 97	2,8 ± 0,1	6,8 ± 0,3	16% ± 2%

Tabel 19: Karakterisering van stalen uit CSTR-reactoren (n=7)

Staal	Reactor + dag	OVB (g CZV L ⁻¹ d ⁻¹)	Propionzuur (g HPr-CZV L ⁻¹)	% van theor. biogasprod.	Ripley- index
11	CSTR C Dag 133	Opstart	2,3*	80%*	0,50*
12	CSTR C Dag 153	1,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1	82% ± 11%	0,31 ± 0,01
13	CSTR C Dag 169	2,0 ± 0,1	2,7 ± 0,1	79% ± 2%	0,33 ± 0,02
14	CSTR C Dag 183	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,2	38% ± 20%	0,45 ± 0,03
15	CSTR D Dag 133	Opstart	2,3*	80%*	0,44*
16	CSTR D Dag 153	1,6 ± 0,1	2,6 ± 0,5	84 % ± 9%	0,31 ± 0,01
17	CSTR D Dag 169	2,3 ± 0,1	2,9 ± 0,2	83% ± 7%	0,31 ± 0,01
18	CSTR D Dag 183	2,5 ± 0,1	3,4 ± 0,2	40% ± 13%	0,43 ± 0,02

* n=1

3.2 DNA-extractie

Agarose gel elektroforese na DNA-extractie toonde bij alle stalen een duidelijke DNA-band van ongeveer 11000 baseparen. De nucleïnezuurconcentratie en zuiverheid werd spectrofotometrisch bepaald met behulp van Nanodrop. De resultaten van deze analyse zijn weergegeven in Tabel 20. De gemeten nucleïnezuurconcentraties waren voldoende om PCR te kunnen toepassen.

Tabel 20: Concentratie en zuiverheid van geëxtraheerd DNA

Staal	Reactor + dag	Nucleïnezuurconc.	260:280	260:230
		(ng μL^{-1})		
1	CTR A Dag 54	547,9	1,87	1,39
2	CTR A Dag 72	144,5	1,68	0,92
3	CTR A Dag 86	114,6	1,75	0,91
4	CTR B Dag 54	603,5	1,79	1,22
5	CTR B Dag 72	106,3	1,69	0,87
6	CTR B Dag 86	101,8	1,66	0,75
7	CTR C Dag 80	282,2	1,60	1,09
8	CTR C Dag 97	395,4	1,60	1,06
9	CTR D Dag 80	123,7	1,67	1,22
10	CTR D Dag 97	259,4	1,61	0,91
11	CSTR C Dag 133	200,4	1,76	1,36
12	CSTR C Dag 153	411,9	1,84	1,44
13	CSTR C Dag 169	196,9	1,76	1,17
14	CSTR C Dag 183	123,8	1,83	1,38
15	CSTR D Dag 133	104,5	1,88	1,46
16	CSTR D Dag 153	205,2	1,84	1,36
17	CSTR D Dag 169	155,7	1,85	1,43
18	CSTR D Dag 183	188,0	1,86	1,47

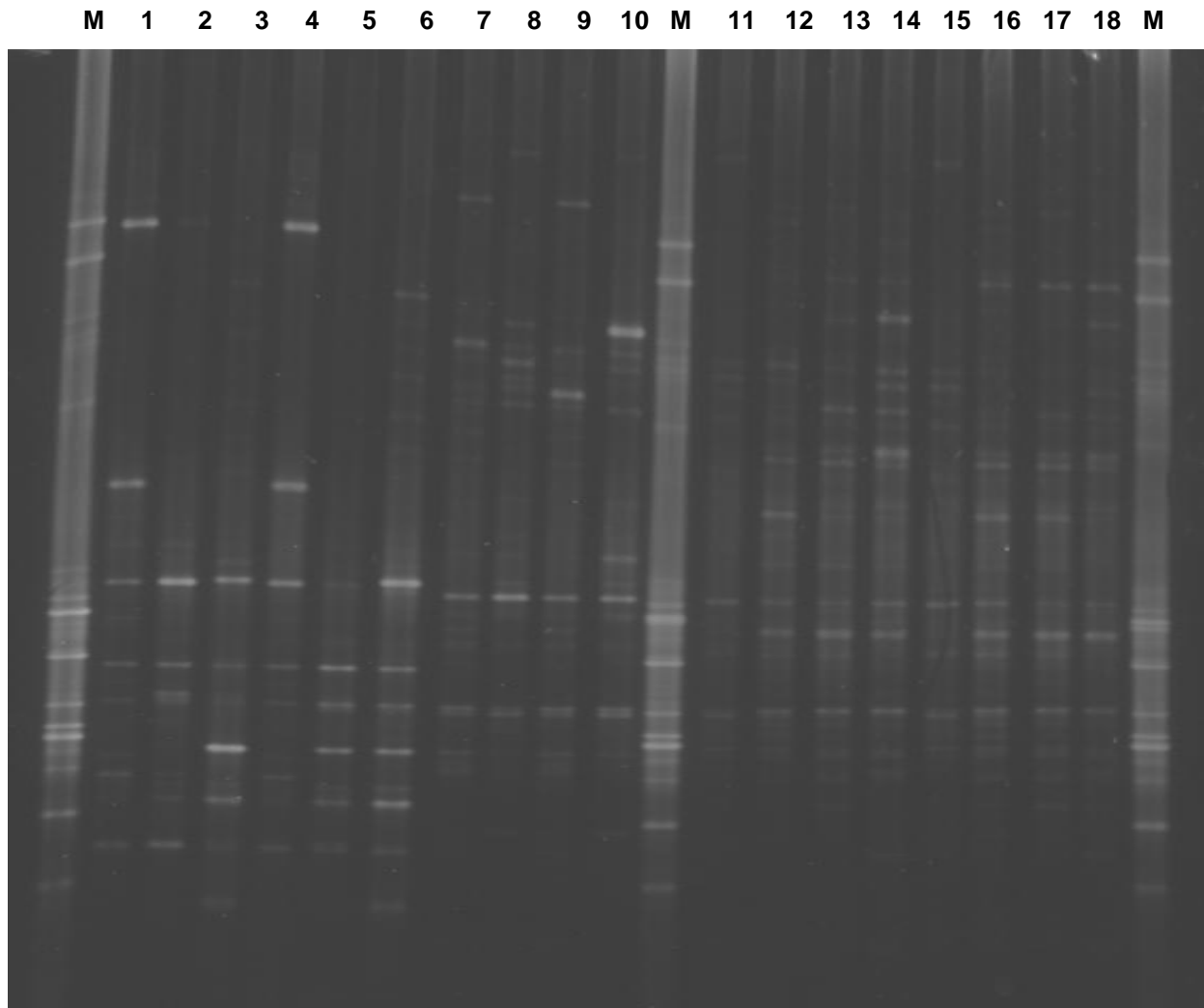
De 260:280 parameter geeft de verhouding tussen extinctie bij 260 nm en bij 280 nm. Dit is een indicatie voor de kwaliteit van de bekomen nucleïnezuren en ligt rond 1,8 voor DNA van voldoende zuiverheid (Doshi et al., 2009). Een lagere verhouding wijst op aanwezigheid van proteïnen, fenol of andere contaminanten. De gemeten waarden voor de stalen waren aanvaardbaar tussen 1,60 en 1,88.

De 260:230 parameter is een tweede meting voor de nucleïnezuurzuiverheid die best tussen 1,8 en 2,2 ligt (Claros en Canovas, 1998). De waarden voor alle stalen waren lager dan deze richtwaarden, waarschijnlijk doordat zouten of solventen (zoals fenol en chloroform) mee geprecipiteerd waren. Een extra precipitatiestap met ethanol of PEG kan dit verbeteren, maar was niet noodzakelijk (Krsek en Wellington, 1999).

3.3 PCR en DGGE *Bacteria*

Na PCR werd bij alle stalen het geamplificeerde *Bacteria*-fragment van 180 baseparen teruggevonden. De positieve en negatieve controle bevestigden dat het resultaat van deze PCR.

De foto met het resultaat van de DGGE-analyse is weergegeven in Figuur 32.



Figuur 32: DGGE-patroon van *Bacteria* aanwezig in CTR en CSTR-reactoren (M = merker)

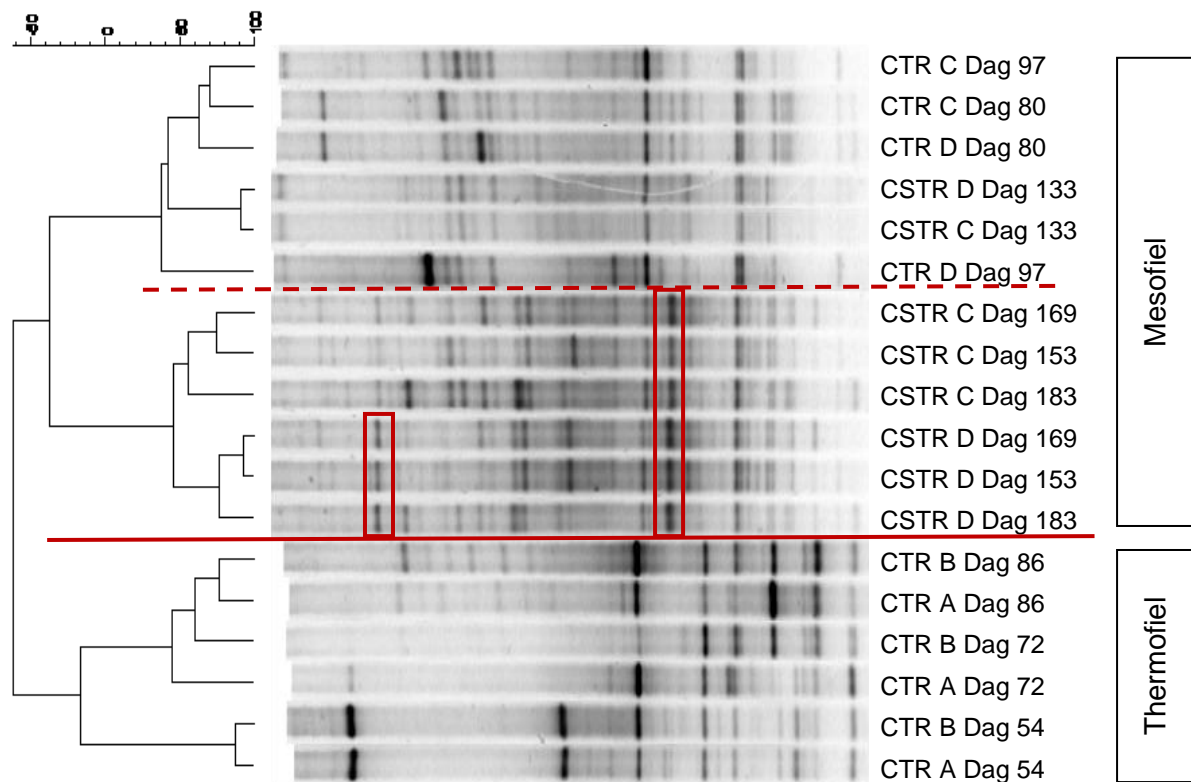
3.4 Interpretatie resultaten DGGE *Bacteria*

Clusteranalyse

De correlatie tussen de DGGE patronen werd onderzocht met behulp van Pearson. De clusteranalyses zijn weergegeven in Figuur 33.

In de clusteranalyse vormden de mesofiele en thermofiele reactoren een aparte cluster. Daarnaast verscheen er bij de mesofiele reactoren een nieuwe band in het DGGE-patroon door de CSTR procesvoering. Tot slot was een extra band zichtbaar bij CSTR D die een hogere OVB te verwerken kreeg.

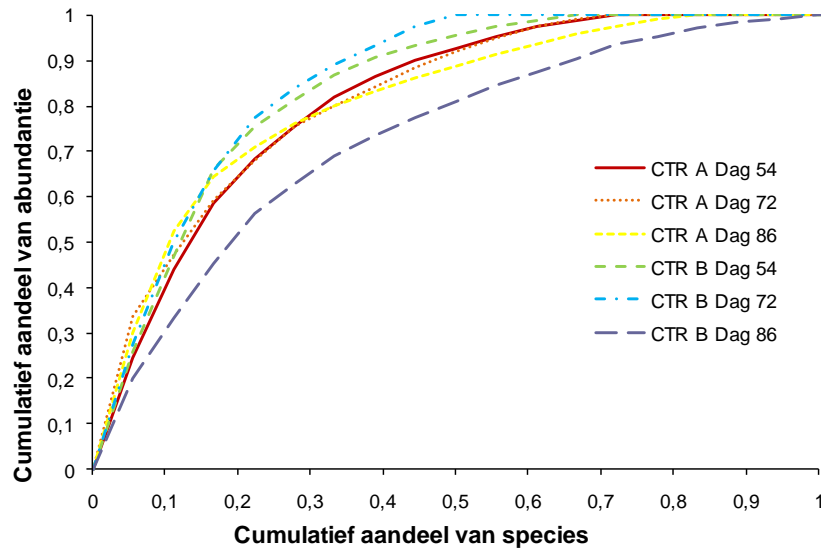
De stalen van de CSTR-reactoren op dag 133 clusterden met de niet-gemengde CTR-reactoren aangezien de CSTR-reactoren werden opgestart met gemengde vloeistof uit de CTR-reactoren. Het mengen en voeden van de CSTR-reactoren startte pas op dag 133, dus het staal van die dag is een initiële karakterisering van de microbiële gemeenschap.



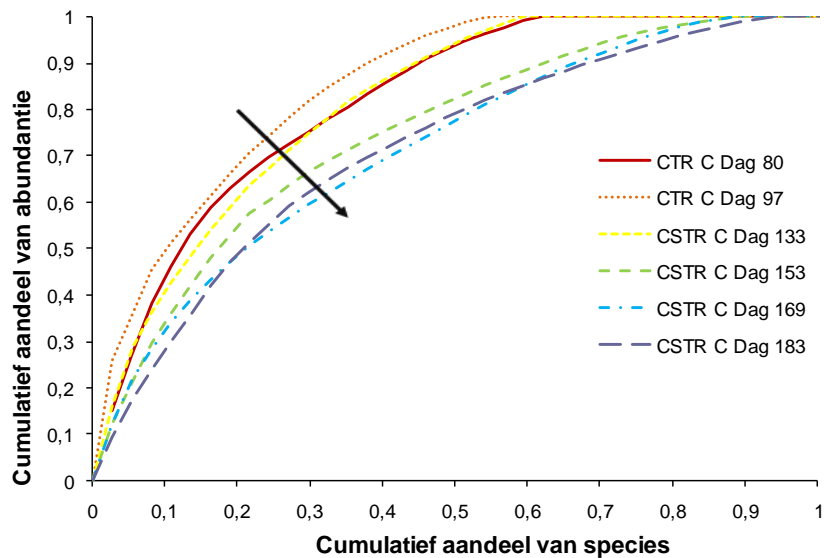
Figuur 33: Correlatie tussen DGGE-patternen voor *Bacteria* in thermofiele en mesofiele reactoren (linkse kader: typerende band voor reactor CSTR D, rechtse kader: typerende band voor CSTR-procesvoering)

Functionele organisatie

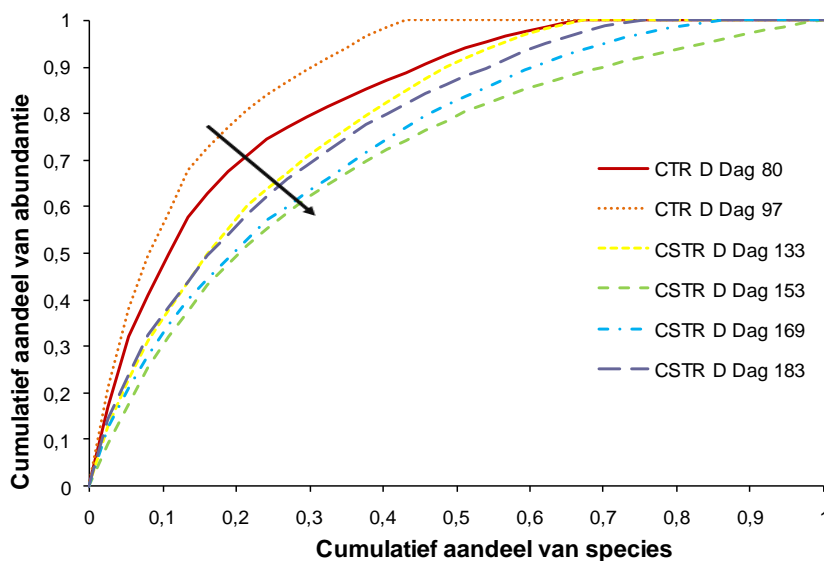
In Figuur 34 tot en met Figuur 36 zijn de Lorenz-curven uitgezet om de functionele organisatie van de microbiële gemeenschap in de reactoren te onderzoeken. In de thermofiele controlereactor bleef de functionele organisatie nagenoeg constant in de tijd. In de thermofiele behandelde reactor neigde de functionele organisatie meer naar gelijkheid op het moment dat de reactor niet meer gevoed werd (CTR B Dag 86). In de mesofiele reactoren benaderde de functionele organisatie meer de eerste bissectrice (45° evenwichtslijn) naarmate de tijd vorderde en/of naarmate de reactoren faalden.



Figuur 34: Lorenz-curven voor *Bacteria* in thermofiele reactoren CTR A en CTR B



Figuur 35: Lorenz-curven voor *Bacteria* in mesofiele controlereactoren CTR C en CSTR C



Figuur 36: Lorenz-curven voor *Bacteria* in mesofiele behandelingsreactoren CTR D en CSTR D

Similariteit

De similariteitsmatrix voor *Bacteria* in CTR en CSTR-reactoren werd berekend op basis van het DGGE-patroon en is weergegeven in Tabel 21. Aan de hand van deze resultaten werd de dynamica van de microbiële gemeenschap berekend in de volgende paragraaf.

Tabel 21: Similariteit voor *Bacteria* in CTR en CSTR-reactoren

	CSTR D Dag 133	CSTR C Dag 133	CTR C Dag 97	CTR D Dag 97	CTR D Dag 80	CTR C Dag 80	CSTR C Dag 169	CSTR C Dag 153	CSTR C Dag 183	CSTR D Dag 169	CSTR D Dag 153	CSTR D Dag 183	CTR B Dag 86	CTR A Dag 86	CTR B Dag 72	CTR A Dag 72	CTR B Dag 54	CTR A Dag 54
CSTR D Dag 133	100.00																	
CSTR C Dag 133	91.33	100.00																
CTR C Dag 97	67.68	71.43	100.00															
CTR D Dag 97	46.79	48.56	60.04	100.00														
CTR D Dag 80	44.44	47.67	59.87	32.17	100.00													
CTR C Dag 80	53.56	56.49	67.00	47.51	68.06	100.00												
CSTR C Dag 169	41.17	31.11	21.76	16.37	41.35	36.05	100.00											
CSTR C Dag 153	58.85	55.14	32.96	27.31	31.16	39.33	74.59	100.00										
CSTR C Dag 183	42.02	39.19	30.82	23.27	36.91	38.89	66.16	55.22	100.00									
CSTR D Dag 169	35.78	25.89	12.55	9.04	22.71	23.56	80.45	67.04	53.73	100.00								
CSTR D Dag 153	45.17	36.84	20.37	17.73	22.82	30.49	72.71	71.69	51.72	92.41	100.00							
CSTR D Dag 183	29.85	21.77	15.48	7.40	22.77	23.57	69.67	48.46	60.89	84.03	75.95	100.00						
CTR B Dag 86	10.03	7.01	25.43	19.27	9.31	16.23	7.41	3.02	4.53	5.67	4.19	4.67	100.00					
CTR A Dag 86	0.00	1.06	8.62	6.44	8.27	14.82	1.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	77.07	100.00				
CTR B Dag 72	5.93	7.47	8.87	9.79	16.80	22.91	12.74	5.47	8.61	8.85	10.37	6.26	64.40	64.15	100.00			
CTR A Dag 72	4.73	1.54	23.35	12.93	3.80	7.60	0.00	0.00	0.00	1.68	2.04	1.68	71.76	44.51	42.17	100.00		
CTR B Dag 54	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	4.13	0.00	7.26	7.13	0.00	29.85	19.15	16.72	48.34	100.00	
CTR A Dag 54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.80	8.22	0.71	12.92	13.10	1.15	16.03	9.13	16.92	35.09	87.24	100.00

Dynamica

Met behulp van de similariteitsmatrix werd de dynamica in de anaerobe reactoren berekend. De resultaten zijn opgenomen in Tabel 22 en geven een indicatie van het aantal species dat gemiddeld tot een significante dominantie kwam (boven de detectielimiet van de techniek) gedurende de hydraulische verblijftijd van 18 dagen.

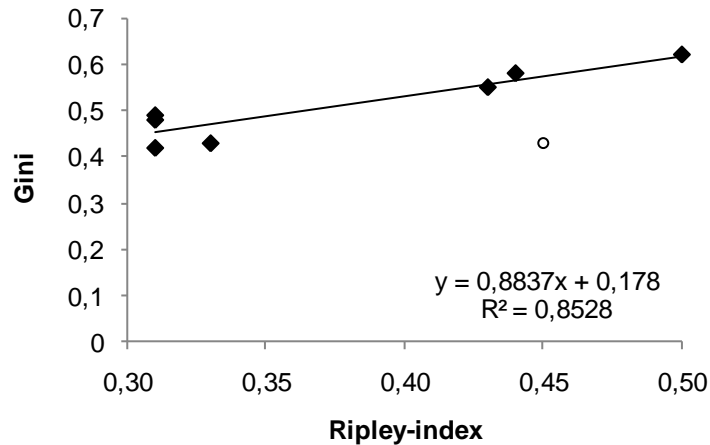
Tabel 22: Dynamica *Bacteria* in CTR en CSTR-reactoren (per hydraulische verblijftijd van 18 dagen)

	Dag 54-72	Dag 72-86		Dag 80-97
CTR A	65%	71%	CTR C	42%
CTR B	83%	46%	CTR D	72%

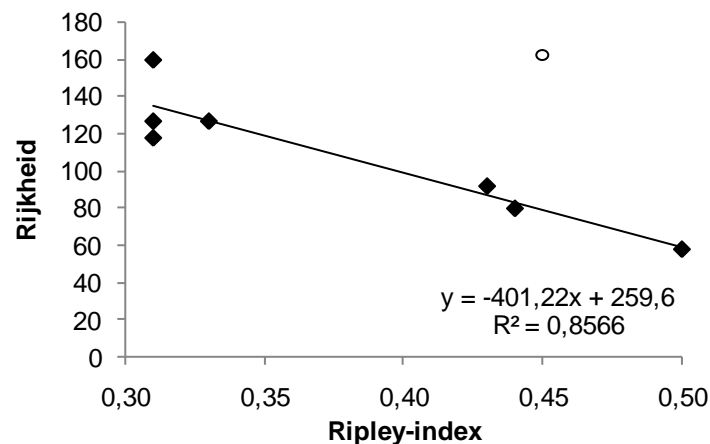
	Dag 133-153	Dag 153-169	Dag 169-183
CSTR C	45%	25%	44%
CSTR D	55%	8%	21%

Correlatie tussen microbiële parameters *Bacteria* en reactorparameters in CTR en CSTR-reactoren

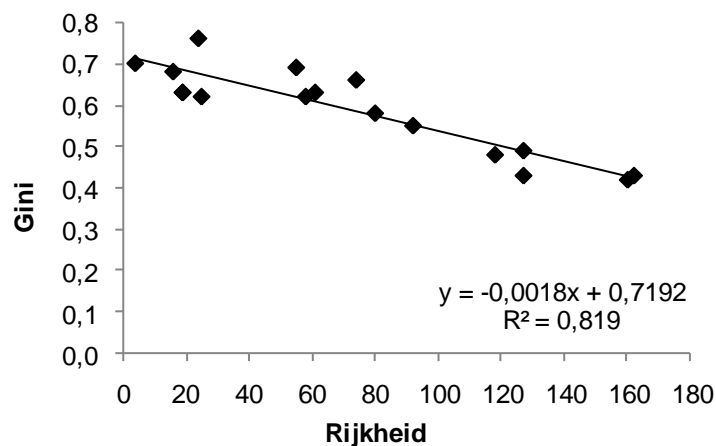
Figuur 37 tot en met Figuur 39 geven een grafische voorstelling van de correlatie tussen de microbiële parameters en de reactorparameters. Het datapunt CSTR C dag 183 (o) werd als uitschieter weggelaten voor de berekening van de regressierechte in Figuur 37 en Figuur 38. Tussen Gini of rijkheid en de theoretische biogasproductie werd geen correlatie waargenomen.



Figuur 37: Correlatie tussen Gini-coëfficiënt *Bacteria* en Ripley-index in mesofiele CSTR-reactoren



Figuur 38: Correlatie tussen rijkheid *Bacteria* en Ripley-index in mesofiele CSTR-reactoren

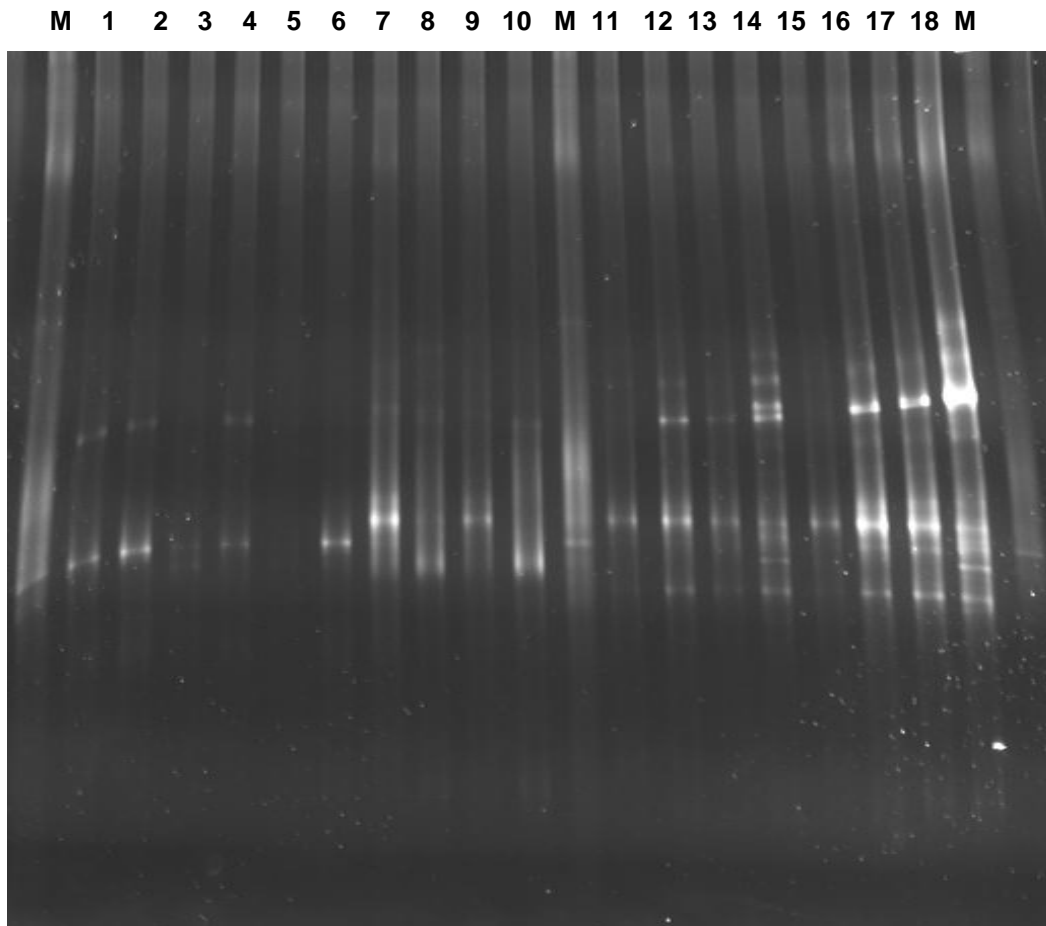


Figuur 39: Correlatie tussen Gini-coëfficiënt en rijkheid *Bacteria* in mesofiele en thermofiele CTR en CSTR-reactoren

3.5 DGGE *Archaea*

Voor alle stalen, met uitzondering van het staal van CTR B op dag 72, was de PCR-amplificatie succesvol. Het geamplificeerde fragment bestond uit 437 baseparen.

Het resultaat van de DGGE-analyse is weergegeven in Figuur 40.



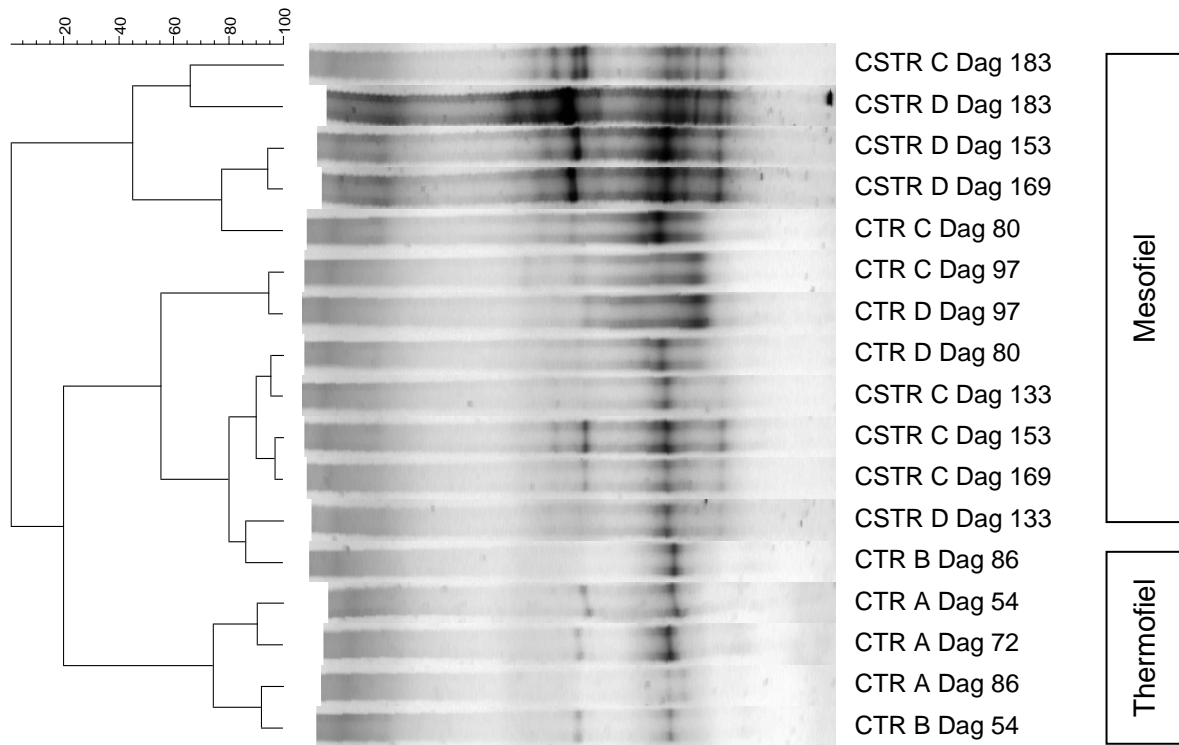
Figuur 40: DGGE-patroon van *Archaea* aanwezig in CTR en CSTR-reactoren (M = merker)

3.6 Interpretatie resultaten DGGE *Archaea*

Clusteranalyse

De clusteranalyses op basis van Pearson zijn weergegeven in Figuur 41.

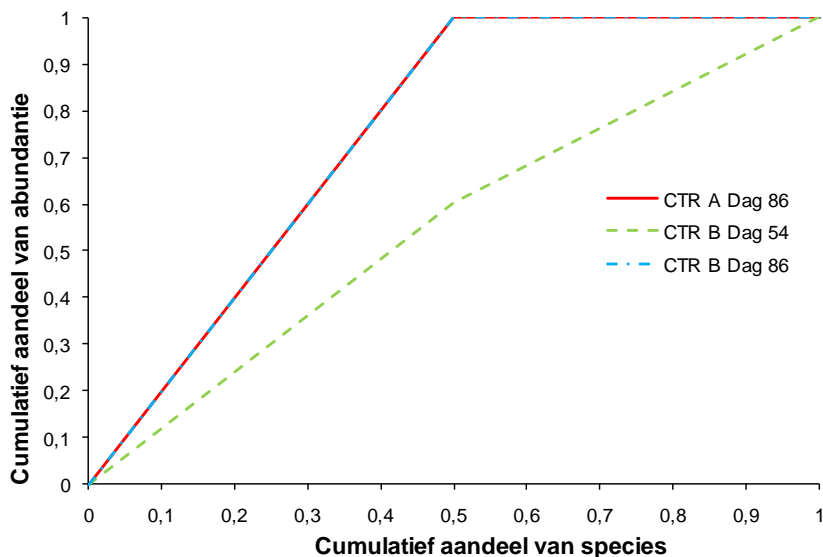
In de clusteranalyse voor *Archaea* in CTR en CSTR-reactoren was het onderscheid tussen mesofiele en thermofiele reactoren minder duidelijk dan in de bacteriële gemeenschap, aangezien één thermofiel staal met mesofiele stalen was geclusterd.



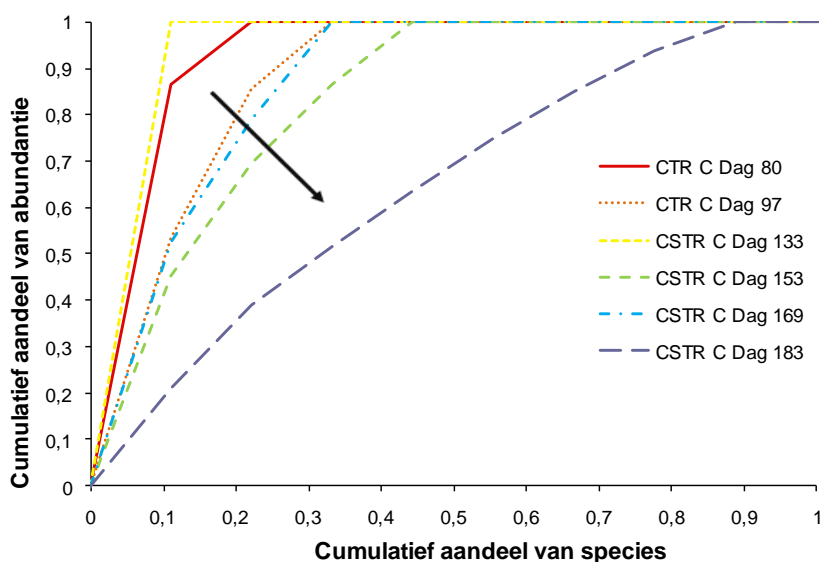
Figuur 41: Correlatie tussen DGGE-patternen voor *Archaea* in thermofiele en mesofiele CTR en CSTR-reactoren

Functionele organisatie

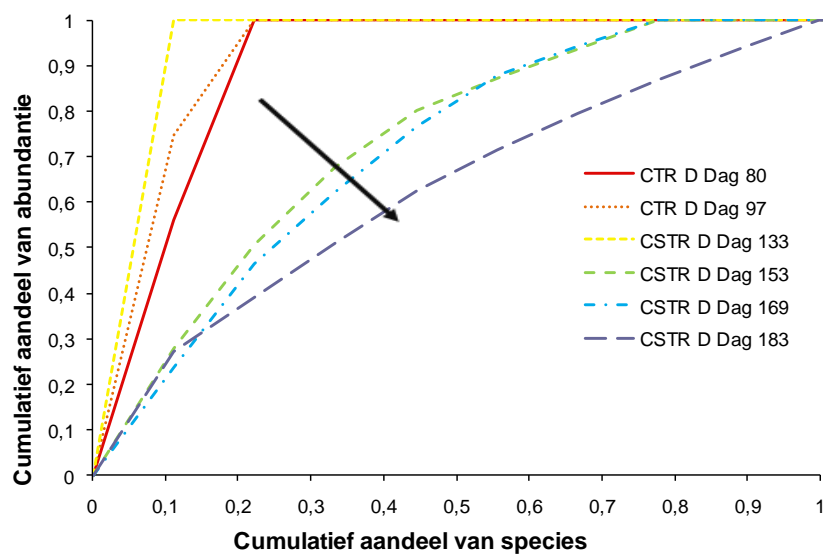
In Figuur 42 tot en met Figuur 44 zijn de Lorenz-curven uitgezet om de functionele organisatie van de *Archaea*-gemeenschap in de reactoren te onderzoeken. In de mesofiele reactoren neigde de functionele organisatie van de *Archaea* in de tijd meer naar gelijkheid, wat overeenkwam met de waarnemingen in de *Bacteria*-gemeenschap. Voor de thermofiele reactoren kon aan de hand van het DGGE-patroon slechts van 3 stalen de functionele organisatie bepaald worden.



Figuur 42: Lorenz-curven voor *Archaea* in thermofiele reactoren



Figuur 43: Lorenz-curven voor *Archaea* in mesofiele controlereactoren CTR C en CSTR C



Figuur 44: Lorenz-curven voor *Archaea* in mesofiele behandelingenreactoren CTR D en CSTR D

Similariteit

De similariteitsmatrix voor *Archaea* in CTR en CSTR-reactoren werd berekend op basis van het DGGE-patroon en is weergegeven in Tabel 23. Deze resultaten laten toe om de dynamica van de microbiële gemeenschap te bepalen in de volgende paragraaf.

Tabel 23: Similariteit voor *Archaea* in CTR en CSTR-reactoren

	CSTR C Dag 183	CSTR D Dag 183	CSTR D Dag 153	CSTR D Dag 169	CTR C Dag 80	CTR C Dag 97	CTR D Dag 97	CTR D Dag 80	CSTR C Dag 133	CSTR C Dag 153	CSTR C Dag 169	CSTR D Dag 133	CTR B Dag 86	CTR A Dag 54	CTR A Dag 72	CTR A Dag 86	CTR B Dag 54
CSTR C Dag 183	100																
CSTR D Dag 183	65,89	100															
CSTR D Dag 153	75,48	61,34	100														
CSTR D Dag 169	73,16	75,85	94,17	100													
CTR C Dag 80	51,19	41,38	83,26	79,71	100												
CTR C Dag 97	63,77	45,4	67,29	69,24	76,37	100											
CTR D Dag 97	61,57	39,13	58,25	62,25	67,2	94,8	100										
CTR D Dag 80	62,89	43,17	64,77	64,97	79,35	85,7	82,11	100									
CSTR C Dag 133	65,12	42,26	62,23	61,31	70,82	79	79,28	95,44	100								
CSTR C Dag 153	78,23	51,11	78,07	75,6	78,59	80,01	77,38	92,24	93,97	100							
CSTR C Dag 169	77,35	49,22	72,62	71,73	74,45	83,17	80,63	92,17	93,95	96,83	100						
CSTR D Dag 133	70,29	47,9	65,49	65,82	65,76	74,45	71,79	86,21	88,55	89,03	92,16	100					
CTR B Dag 86	56,07	36,36	49,8	48,57	60,17	72,45	68,29	84,97	87,34	80,29	85,84	86,25	100				
CTR A Dag 54	52,31	51,97	51,37	54,36	53,35	57,03	51,21	66,13	66,21	66,51	68,92	73,85	74,19	100			
CTR A Dag 72	53,43	49,51	63,45	62,77	63,82	60,79	53,45	73,16	75,09	76,63	77,25	80,45	79,19	90,37	100		
CTR A Dag 86	43,53	41,27	32,99	38,11	40,75	53,32	49,71	68,99	68,62	61,03	66,61	73,85	76,97	85,15	84,53	100	
CTR B Dag 54	53,16	39,29	38,64	38,79	41,74	56,55	53,49	74,45	76,29	68,67	73,49	80,23	84,8	79,69	80,97	92,14	100

Dynamica

De dynamica van de *Archaea*-gemeenschap in de anaerobe reactoren werd berekend op basis van de similariteitswaarden (Tabel 24).

Tabel 24: Dynamica voor *Archaea* in CTR en CSTR-reactoren (per hydraulische verblijftijd van 18 dagen)

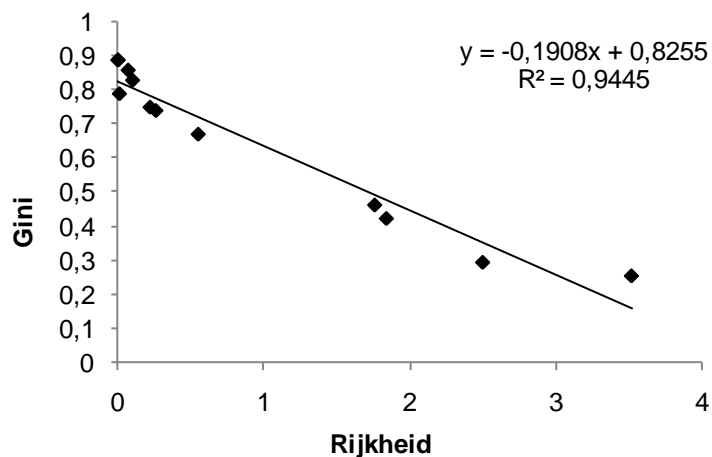
	Dag 54-72	Dag 72-86	Dag 80-97	
CTR A	10%	19%	CTR C	25%
CTR B	n.a.*	n.a.	CTR D	19%

*n.a. = niet geanalyseerd

	Dag 133-153	Dag 153-169	Dag 169-183
CSTR C	5%	3%	30%
CSTR D	32%	7%	31%

Correlatie tussen microbiële parameters *Archaea* en reactorparameters in CTR en CSTR-reactoren

Figuur 45 toont aan dat er voor *Archaea* een sterk verband was tussen Gini-coëfficiënt en rijkheid van de microbiële gemeenschap. Er werd geen correlatie gevonden tussen microbiële parameters en biogasproductie of Ripley-index.



Figuur 45: Correlatie tussen Gini-coëfficiënt en rijkheid voor *Archaea* in mesofiele CTR en CSTR-reactoren

3.7 Samenvatting microbiële analyses

In Tabel 25 is een overzicht gegeven van de belangrijkste parameters die bepaald werden voor de continue mesofiele en thermofiele reactoren, zowel de reactorparameters als de microbiële parameters voor de *Bacteria* en *Archaea* gemeenschap.

Tabel 25: Samenvatting reactorparameters en microbiële parameters voor *Bacteria* en *Archaea* in mesofiele en thermofiele CTR en CSTR-reactoren (n=7)

Reactor + dag	OVB (g CZV L ⁻¹ d ⁻¹)	Propionzuur (g HPr-CZV L ⁻¹)	% van theor. biogasproductie	Ripley- index	Gini <i>Bacteria</i>	F ₂₀ <i>Bacteria</i>	Rijkheid <i>Bacteria</i>	Gini <i>Archaea</i>	F ₂₀ <i>Archaea</i>	Rijkheid <i>Archaea</i>
CTR A Dag 54	1,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	52% ± 8%		0,63	0,65	19	n.a.**	n.a.	0
CTR A Dag 72	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,2	7% ± 2%		0,63	0,65	19	n.a.	n.a.	0
CTR A Dag 86	2,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	5% ± 3%		0,63	0,69	25	0,50	0,40	0
CTR B Dag 54	2,0 ± 0,1	0,7 ± 0,3	120% ± 15%		0,68	0,72	16	0,10	0,24	0,08
CTR B Dag 72	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1	33% ± 13%		0,70	0,73	4	n.a.	n.a.	n.d.
CTR B Dag 86	Geen voeding	2,9 ± 0,1	1% ± 1%		0,46	0,53	35	0,50	0,40	0
CTR C Dag 80	2,2 ± 0,1	4,5 ± 0,4	36% ± 2%		0,63	0,64	61	0,86	0,96	0,07
CTR C Dag 97	2,0 ± 0,1	6,2 ± 0,1	12% ± 5%		0,69	0,68	55	0,75	0,77	0,22
CSTR C Dag 133	Opstart	2,3*	80%*	0,50*	0,62	0,60	58	0,89	1,00	0
CSTR C Dag 153	1,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1	82% ± 11%	0,31 ± 0,01	0,49	0,54	127	0,67	0,63	0,55
CSTR C Dag 169	2,0 ± 0,1	2,7 ± 0,1	79% ± 2%	0,33 ± 0,02	0,43	0,48	127	0,74	0,71	0,26
CSTR C Dag 183	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,2	38% ± 20%	0,45 ± 0,03	0,43	0,48	162	0,29	0,35	2,50
CTR D Dag 80	2,2 ± 0,1	5,2 ± 0,5	29% ± 7%		0,66	0,68	74	0,79	0,90	0,01
CTR D Dag 97	2,8 ± 0,1	6,8 ± 0,3	16% ± 2%		0,76	0,78	24	0,83	0,92	0,10
CSTR D Dag 133	Opstart	2,3*	80%*	0,44*	0,58	0,57	80	0,89	1,00	0
CSTR D Dag 153	1,6 ± 0,1	2,6 ± 0,5	84 % ± 9%	0,31 ± 0,01	0,42	0,49	160	0,46	0,46	1,76
CSTR D Dag 169	2,3 ± 0,1	2,9 ± 0,2	83% ± 7%	0,31 ± 0,01	0,48	0,50	118	0,42	0,42	1,84
CSTR D Dag 183	2,5 ± 0,1	3,4 ± 0,2	40% ± 13%	0,43 ± 0,02	0,55	0,56	92	0,25	0,35	3,52

*n = 1, **n.a. = niet geanalyseerd

Hoofdstuk 4 Herstel van gefaalde reactoren

4.1 Ijzersulfaat

Om het effect van ijzersulfaat op het herstel van gefaalde reactoren na te gaan, werden twee mesofiele batchreactoren opgestart met gemengde vloeistof afkomstig van gefaalde reactoren uit het labo. In de controlereactor werd gewacht op spontaan herstel en de behandelingsreactor kreeg 0,01 g FeSO₄ d⁻¹.

Na 40 dagen was de biogasproductie nog steeds niet op gang gekomen, noch in de controlereactor, noch in de reactor behandeld met ijzersulfaat. De pH was initieel met NaOH op 8,0 gebracht, maar was na 40 dagen gedaald tot 7,2. Aangezien er geen verbetering zichtbaar was, werd dit experiment stopgezet.

4.2 Micronutriënten in de vorm van methanostim liquide

Twee verschillende toedieningswijzen van ML (dagelijks en wekelijks) en twee verschillende hoeveelheden (default: 1µL ML L⁻¹ d⁻¹, boost: 15µL ML L⁻¹ d⁻¹) werden gedoseerd om het effect van ML uit te testen op herstel van gefaalde anaerobe reactoren. De reactoren werden niet gevoed, met uitzondering van ML-dosissen gedurende de eerste 18 dagen van het experiment.

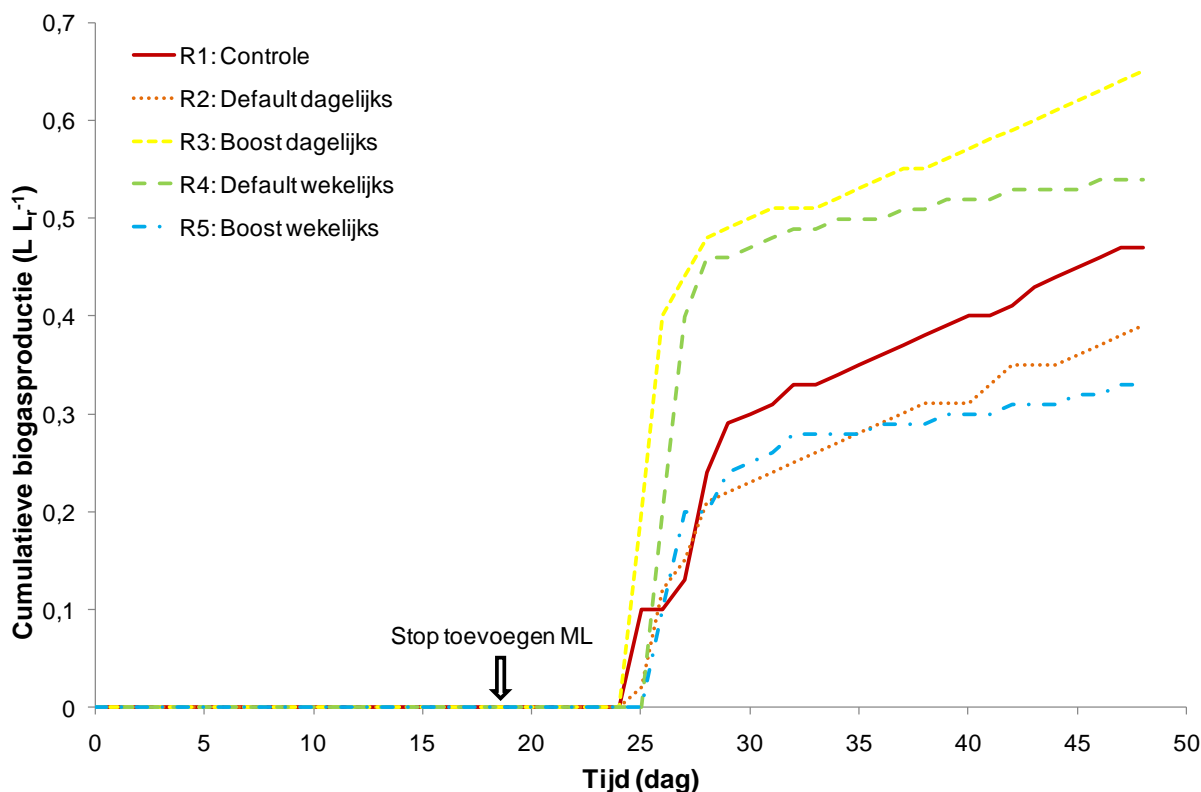
4.2.1 Mesofiele reactoren

De pH van de mesofiele batchreactoren daalde voor alle reactoren naarmate het experiment vorderde zoals Tabel 26 weergeeft. De controlereactor had de hoogste pH, maar de verschillen zijn verwaarloosbaar.

Tabel 26: pH waarden van mesofiele batchreactoren met ML dosering

Dag	R1	R2	R3	R4	R5
	Controle	Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
6	7,80	7,87	7,83	7,89	7,82
14	7,61	7,56	7,51	7,55	7,51
21	7,66	7,53	7,44	7,44	7,38
28	7,48	7,21	7,26	7,24	7,26
48	7,17	7,14	7,10	7,08	7,08

De cumulatieve biogasproductie wordt voorgesteld in Figuur 46. Tot dag 24 was er geen biogasproductie in de reactoren. Vanaf dag 24 kwam de biogasproductie traag op gang, maar het verschil tussen de reactoren was zeer klein. Op dag 48 hadden de reactoren 0,3 tot 0,6 L L⁻¹ biogas geproduceerd over de ganse periode van het experiment. De dagelijks boost gedoseerde en wekelijks default gedoseerde reactor vertoonden een iets hogere productie, maar de verschillen waren te klein om significant te noemen.



Figuur 46: Cumulatieve biogasproductie mesofiele batchreactoren met ML dosering

De opgeloste CZV concentraties uit Tabel 27 schommelden tussen 20 en 28 g CZV L⁻¹. De concentraties stegen in de periode waarin ML werd toegevoegd, want dit is ook een vorm van CZV. Aangezien deze reactoren amper biogas produceerden, was er accumulatie van CZV. Na het stopzetten van de ML dosering op dag 18, namen de opgeloste CZV concentraties af tot ongeveer 20 g CZV L⁻¹ op dag 48. Alle reactoren vertoonden een gelijkaardige evolutie.

Tabel 27: CZVs waarden van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L⁻¹)

Dag	R1 Controle	R2 Default Dagelijks	R3 Boost Dagelijks	R4 Default Wekelijks	R5 Boost Wekelijks
0	20,9	20,9	20,9	20,9	20,9
6	27,0	24,2	24,6	24,1	25,5
14	22,0	21,3	20,7	23,2	22,8
21	27,1	27,6	26,5	26,8	25,9
28	26,8	26,7	24,6	26,2	25,9
48	20,4	20,0	19,6	20,0	21,1

Initieel was er 41 g totale CZV L⁻¹ aanwezig in de reactoren. De totale CZV concentraties waren na 28 dagen hoger dan de concentraties bij aanvang van het experiment. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de aangroei van biomassa en door de verhoging van de oplosbare CZV concentraties, omdat eenzelfde evolutie in alle reactoren werd waargenomen. Op dag 48 was de

totale CZV concentratie gedaald tot ongeveer 38 g CZV L⁻¹ voor de controlereactor, de dagelijks default gedoseerde en de wekelijks boost gedoseerde. Bij de twee reactoren die het meeste biogas geproduceerd hadden, de dagelijks boost gedoseerde en wekelijks default gedoseerde reactor, was de totale CZV concentratie gestegen tot respectievelijk 53 g CZV L⁻¹ en 43 g CZV L⁻¹.

Tabel 28: CZVt waarden van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L⁻¹)

Dag	R1 Controle	R2	R3	R4	R5
		Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	41,2	41,2	41,2	41,2	41,2
28	55,2	52,4	51,2	41,6	47,6
48	37,0	39,4	53,3	43,3	37,7

De propionzuur- en azijnzuurconcentraties daalden initieel, maar na een periode van 20 dagen waren de concentraties in dezelfde grootte-orde als bij aanvang van het experiment en namen ze zelfs nog toe naar het einde van het experiment tot ongeveer 3 g L⁻¹ propionzuur en 9 g L⁻¹ azijnzuur. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 29 en Tabel 30. De propionzuurconcentraties waren hoger dan 2 g L⁻¹, dus de reactoren waren niet hersteld, zoals bevestigd werd door de lage biogasproductie.

Tabel 29: Propionzuurconcentraties van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g L⁻¹)

Dag	R1 Controle	R2	R3	R4	R5
		Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
6	1,56	1,44	1,12	2,60	2,64
14	2,60	2,64	2,08	2,48	2,52
21	3,24	3,32	3,16	3,04	3,20
28	2,92	2,32	2,64	2,48	2,88
48	3,23	3,35	3,07	3,14	3,18

Tabel 30: Azijnzuurconcentraties van mesofiele batchreactoren met ML dosering (g L⁻¹)

Dag	R1 Controle	R2	R3	R	R5
		Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	6,32	6,32	6,32	6,32	6,32
6	3,12	2,96	2,76	5,24	5,56
14	5,24	5,56	4,28	4,88	4,68
21	7,32	7,80	7,00	7,24	7,72
28	7,04	5,04	6,44	4,92	6,80
48	9,67	9,83	9,30	9,20	9,40

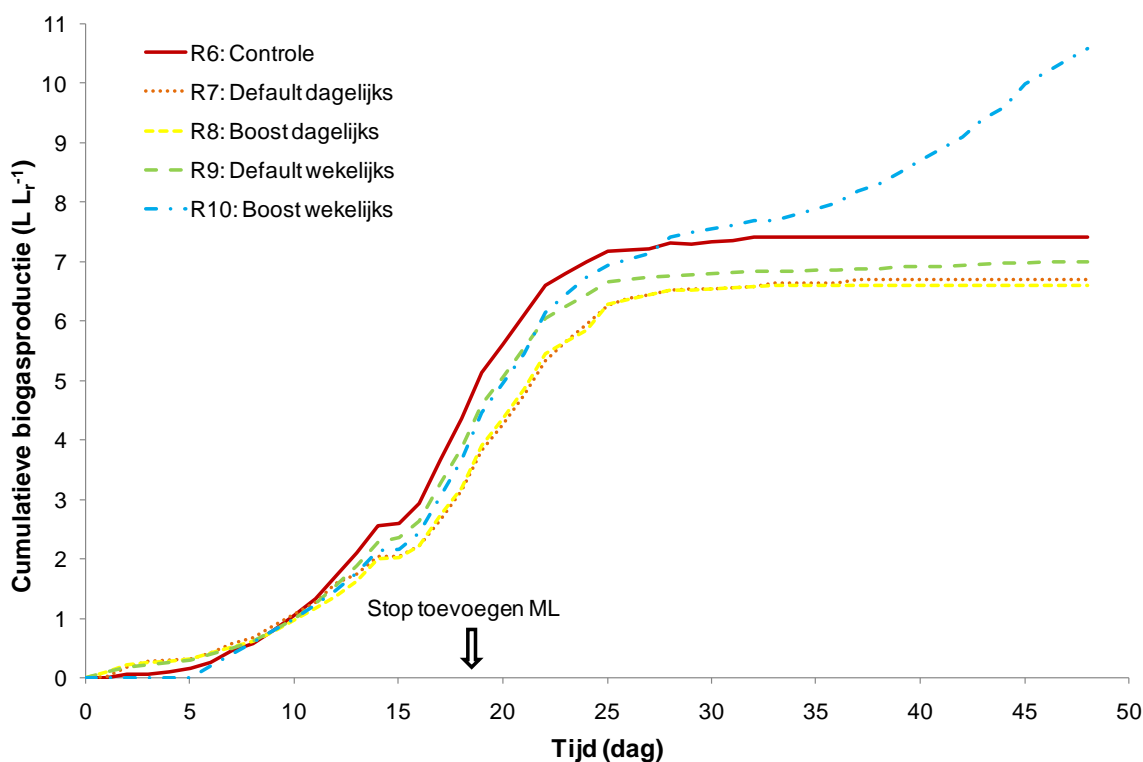
4.2.2 Thermofiele reactoren

De pH waarden van de thermofiele reactoren namen initieel af, maar vanaf dag 14 steeg de pH weer (Tabel 31). De resultaten voor de verschillende reactoren waren zeer gelijkaardig. Op het einde van het experiment was de pH weer gedaald tot waarden tussen 7,94 en 8,26.

Tabel 31: pH waarden van thermofiele batchreactoren met ML dosering

Dag	R6 Controle	R7 Default Dagelijks	R8 Boost Dagelijks	R9 Default Wekelijks	R10 Boost Wekelijks
6	7,67	7,71	7,66	7,73	7,64
14	7,52	7,49	7,49	7,50	7,41
21	8,03	7,98	8,00	8,03	7,94
28	8,32	8,36	8,27	8,28	8,30
48	7,94	8,26	8,20	8,15	7,89

Voor de thermofiele batchreactoren was er van bij aanvang van het experiment biogasproductie waarneembaar zoals te zien is in Figuur 47. Het herstel was dus al deels begonnen, wat bevestigd werd door de lagere propionzuurconcentraties in Tabel 34. In de periode van dag 10 tot dag 28 waren er geen significante verschillen tussen de biogasproductie van de reactoren op te merken. Na 30 dagen stagneerde de cumulatieve biogasproductie gemiddeld op 7 L L^{-1} , de reactoren waren afgegist. Enkel de reactor die initieel wekelijks een boost-dosis ML toegediend kreeg, bleef extra biogas produceren tot $10,5 \text{ L L}^{-1}$ op dag 48. Op lange termijn leverde deze strategie dus het meeste biogas op.



Figuur 47: Cumulatieve biogasproductie thermofiele bathreactoren met ML dosering

De oplosbare CZV concentraties daalden voor alle reactoren van 30 g CZV L⁻¹ naar ongeveer 8 g CZV L⁻¹ zoals blijkt uit Tabel 32. Er werd 20 g CZV L⁻¹ omgezet naar biogas, wat met de vuistregel 0,5 L per g CZV kan omgerekend worden naar een theoretisch verwachte productie van 10 L biogas. Dit kwam goed overeen met de gemeten cumulatieve biogasproductie (7 L L⁻¹).

Tabel 32: CZVs waarden van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L⁻¹)

Dag	R6	R7	R8	R9	R10
	Controle	Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	29,7	29,7	29,7	29,7	29,7
6	21,2	22,1	22,0	20,5	22,5
14	17,2	17,4	17,9	17,1	18,4
21	18,6	17,5	18,6	17,9	16,6
28	8,7	10,0	8,4	8,0	10,6
48	8,6	7,5	7,3	7,5	6,9

Op basis van de totale CZV concentraties in Tabel 33 kunnen er zelfs nauwkeurigere verbanden gelegd worden met de biogasproductie. De controlereactor, de dagelijks gedoseerde reactoren en de wekelijks default gedoseerde reactor verwijderden slechts 15 tot 20 g CZV L⁻¹, maar voor de wekelijks boost gedoseerde reactor was dit 30 g CZV L⁻¹. De biogasproductie vertoonde gelijkaardige resultaten: de controlereactor, de dagelijks gedoseerde reactoren en de wekelijks default gedoseerde reactor produceerden 7 L L⁻¹, terwijl de wekelijks boost gedoseerde reactor 11 L L⁻¹ produceerden.

Tabel 33: CZVt waarden van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g CZV L⁻¹)

Dag	R6	R7	R8	R9	R10
	Controle	Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	43,4	43,4	43,4	43,4	43,4
28	26,4	30,0	21,6	17,6	16,8
48	24,2	23,7	24,4	22,0	12,8

De propionzuurconcentraties stegen in beperkte mate tijdens het experiment, maar de eindwaarden op dag 48 waren ongeveer 1,4 g L⁻¹, een normale waarde voor gezonde reactoren (Tabel 34).

Tabel 34: Propionzuurconcentraties van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g L⁻¹)

Dag	R6	R7	R8	R9	R10
	Controle	Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
6	2,08	2,48	2,52	1,00	0,92
14	1,00	0,92	0,92	0,88	1,00
21	1,48	1,40	1,36	1,40	1,40
48	1,45	1,22	1,23	1,42	1,50

De azijnzuurconcentraties vertoonden net zoals de propionzuurconcentraties een dalende trend tijdens het experiment zoals te zien is in Tabel 35.

Tabel 35: Azijnzuurconcentraties van thermofiele batchreactoren met ML dosering (g L^{-1})

Dag	R6	R7	R8	R9	R10
	Controle	Default Dagelijks	Boost Dagelijks	Default Wekelijks	Boost Wekelijks
0	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
6	4,28	4,88	4,68	5,80	5,92
14	5,80	5,92	6,24	5,60	6,12
21	3,24	4,76	4,88	4,08	4,08
28	1,00	1,08	0,92	0,92	0,92
48	0,28	0,22	0,26	0,20	0,11

4.3 Ammoniumverwijdering met behulp van membranen

Het doel van deze denkoefening was een alternatief proces onderzoeken voor de vermindering van ammoniumtoxiciteit in anaerobe vergisters. Dit werd immers door Hecht et al. (2009) aangehaald als een vaak voorkomend probleem bij anaerobe vergisting, in het bijzonder met keukenafval als substraat. Theoretisch werd het design onderzocht om continu ammoniak te verwijderen uit de gemengde vloeistof van een vergister aan de hand van een niet-poreus siliconenmembraan. Met behulp van algemene massatransfer coëfficiënten uit de literatuur, kan een eerste schatting gemaakt worden van de haalbaarheid van het project.

Wanneer men gassen wil scheiden van een vloeibare fase met hogere selectiviteit voor het gas, kan men voor niet-poreuze membranen kiezen. Polydimethylsiloxaan (PDMS), een siliconenrubber, is een gasdoorlatend dicht polymeermembraan dat makkelijk beschikbaar is. Gassen migreren door PDMS door een diffusiemechanisme, waarbij de permeabiliteitsnelheid van het gas recht evenredig is met het product van de oplosbaarheid van het gas en de diffusiesnelheid van het opgeloste gas in PDMS. De afzonderlijke termen zijn moeilijk te berekenen voor een specifiek siliconenmembraan, waardoor permeabiliteit vaak experimenteel bepaald wordt. De permeabiliteit van ammoniak door PDMS is $1,45 \cdot 10^{-12} \text{ mol.m}/(\text{m}^2.\text{s.Pa})$ (Vorotyntsev et al., 2009).

Massatransport door een niet-poreus membraan zoals PDMS wordt beschreven door het oplossing-diffusie model. Hierin kunnen drie opeenvolgende stappen onderscheiden worden: eerst sorptie van de component uit het mengsel en oplossing in het membraanmateriaal, daarna transport doorheen het membraan langs een concentratiegradiënt en tot slot desorptie aan de andere kant van het membraan (Bruschke, 1994).

Indien aangenomen wordt dat de dikte van het membraan 0,5 mm is en dat er 4 g L^{-1} ammonium aanwezig is in de thermofiele reactor bij een temperatuur van 53°C en pH 8, kan er berekend worden hoeveel oppervlak aan siliconenbuisjes er nodig is om 1 m^3 gemengde vloeistof van deze anaerobe reactor te behandelen.

In een zijreactor gebeurt continue verwijdering van ammoniak op basis van hetzelfde oplossing-diffusie model of door middel van een zwavelzuuroplossing om de partiële druk van ammoniak in de buisjes terug tot 0 te brengen. Dit resulteert in ideaal massatransport.

De evenwichtsconstante van ammoniak en ammonium wordt beschreven door de volgende evenwichtsvergelijking (Erickson, 1985):

$$K_a = \frac{[\text{NH}_3] [\text{H}]}{[\text{NH}_4^+]}$$

De relatieve concentraties van beide vormen zijn temperatuursafhankelijk (Emerson et al., 1975):

$$\text{p}K_a = 0,09108 + \frac{2729,92}{273,2 + T(^{\circ}\text{C})}$$

Wanneer pH en temperatuur van de oplossing gekend zijn, kan de fractie aan vrij ammoniak berekend worden volgens Clement en Merlin (1995):

$$\text{NH}_3(\%) = \frac{100}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}}$$

Via bovenstaande formules kan uitgerekend worden dat er 1,03 g vrij ammoniak L⁻¹ in de reactor aanwezig is, wat overeenkomt met 0,06 mol ammoniak L⁻¹ aangezien het moleculair gewicht van ammoniak gelijk is aan 17,03 g mol⁻¹.

Sander (1999) stelde de volgende formule voor omtrent de temperatuursafhankelijkheid van de Henry-constante voor ammoniak:

$$\ln K_H = \frac{-4200}{T(\text{K})} + 3,133$$

Bij 53°C (326 K) is de Henry constante gelijk aan $5,8 \cdot 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1} = 5,8 \cdot 10^{-2} \text{ atm}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$

De wet van Henry is gedefinieerd als $K_H = \frac{p_s}{C_w}$ waarbij p_s de partiële ammoniak druk is in de gasfase, uitgedrukt in atmosfeer, in evenwicht met de concentratie C_w (mol m⁻³) van vrij ammoniak in water. De partiële druk van ammoniak is $p_s = 5,8 \cdot 10^{-2} \text{ atm}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1} \times 0,06 \text{ mol L}^{-1} = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ atm}$, of uitgedrukt in SI-eenheden 353 Pa.

Om de flux te berekenen, zal volgende formule toegepast worden:

$$\text{flux} = \text{permeabiliteit} \times \frac{\text{partiële drukgradiënt}}{\text{dikte siliconen buisje}}$$

$$\text{flux} = 1,45 \cdot 10^{-12} \frac{\text{mol}\cdot\text{m}}{\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}} \times \frac{(353 - 0) \text{ Pa}}{0,005 \text{ m}} = 1,0 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{m}^2\cdot\text{s}}$$

Dit betekent dat 1 m² ongeveer $8,6 \cdot 10^{-3}$ mol ammoniak per dag kan verwijderen, wat gelijk is aan 0,15 g ammoniak per dag. Als er 50% verwijdering bekomen moet worden in de veronderstelling dat er 1,03 g vrije ammoniak L⁻¹ in de reactor aanwezig is zoals hierboven berekend, dan komt dit overeen met een benodigd oppervlak van 3450 m² m⁻³.

Hoofdstuk 5 Optimalisatie van anaerobe vergisting

5.1 Micronutriënten in de vorm van methanostim liquide

Om na te gaan welk effect micronutriënten kunnen hebben op de anaerobe vergisting van keukenafval, werden twee samenstellingen van ML gebruikt, waarbij ML-A bestond uit 8% citroenzuur en ML-B uit een hogere citroenzuurconcentratie van 12%.

De resultaten zijn grafisch weergegeven in Figuur 48, Figuur 49 en Figuur 50. Er werden geen significante verschillen opgemerkt in de biogasproductie tussen de verschillende reactoren. Bij een OVB van 1 g CZV L⁻¹ d⁻¹ werd er ongeveer 0,6 L L⁻¹ d⁻¹ geproduceerd en dit steeg tot 2,5 L L⁻¹ d⁻¹ bij een OVB van 4 g CZV L⁻¹. De reactor behandeld met ML-A werd beëindigd op dag 57 wegens experimentele problemen. De controlereactor en de reactor behandeld met ML-B werden verdergezet. Bij een verdere verhoging van de OVB tot 5 g CZV L⁻¹ op dag 56, daalde de biogasproductie tot 0,3 L L⁻¹ d⁻¹, wat duidelijk op falende reactoren wees aangezien dit maar 12% is van de theoretisch verwachte biogasproductie. Er werd eveneens schuimvorming zichtbaar in de reactoren, wat bevestigde dat ze hun maximale OVB bereikt hadden. Bovendien was de pH van de reactoren gezakt tot 6,3. Op dag 74 werd de pH eenmalig verhoogd tot 7,9 door toevoegen van 8 mL NaOH, maar de biogasproductie daalde nog verder tot 0,1 L L⁻¹ d⁻¹. Het voeden van de reactoren werd stopgezet op dag 77 en het experiment werd beëindigd op dag 81.

De totale CZV concentratie daalde in de drie reactoren tijdens de eerste 14 dagen van het experiment van de initiële 18 g CZV L⁻¹ naar 1 g CZV L⁻¹. Deze waarde bleef behouden bij OVB 1 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Bij de OVB stijging tot 4 g CZV L⁻¹ d⁻¹ nam echter ook de totale CZV concentratie in het effluent toe tot 4,5 g CZV L⁻¹ in de reactoren behandeld met ML en zelfs tot 9,0 g CZV L⁻¹ in de controlereactor. Bij de OVB van 5 g CZV L⁻¹ d⁻¹ steeg de totale CZV concentratie tot 36 g CZV L⁻¹. De oplosbare CZV concentraties volgden eenzelfde stijgende trend van 0,5 g CZVs L⁻¹ tot 25 g CZVs L⁻¹.

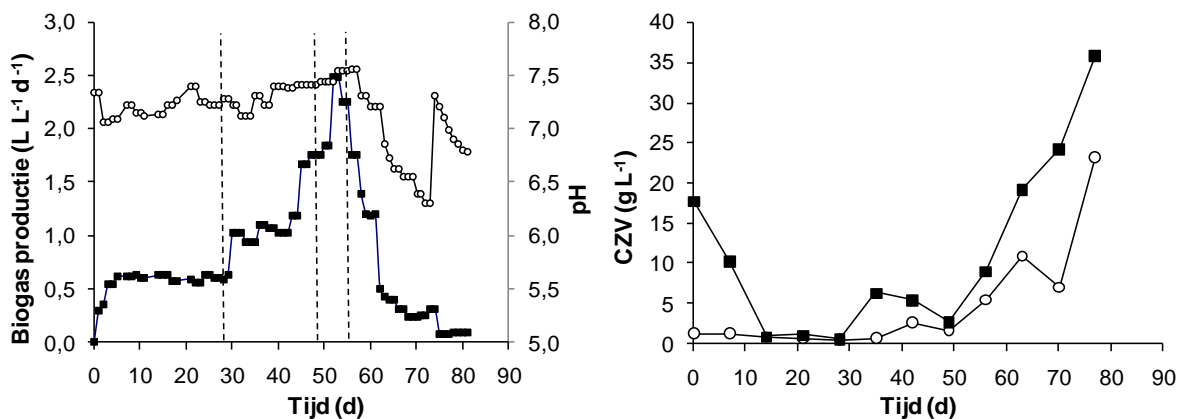
Tabel 36 geeft een overzicht van de concentraties aan bepaalde kationen en anionen in de reactoren op het einde van het experiment.

Tabel 36: Concentraties aan kationen en anionen in batchreactoren op dag 81 (mg L⁻¹)

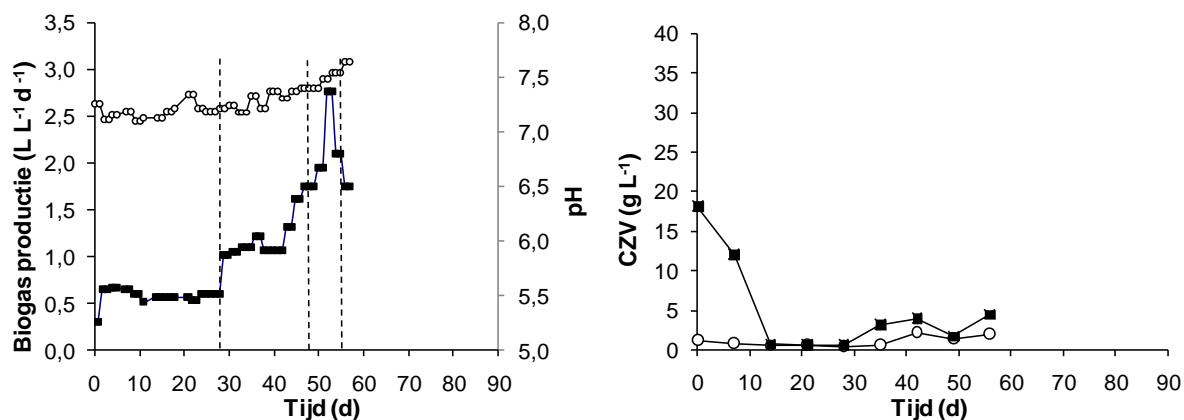
	Fe	Ca ²⁺	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻ -P	SO ₄ ²⁻ -S	Na ⁺
Control	0,6	8,6	1880,5	n.d.	8,5	726,5	138,8	190,6	3197
ML-B	0,5	1,7	1941,0	n.d.	15,4	999,3	242,4	208,2	3078

n.d. = niet gedetecteerd

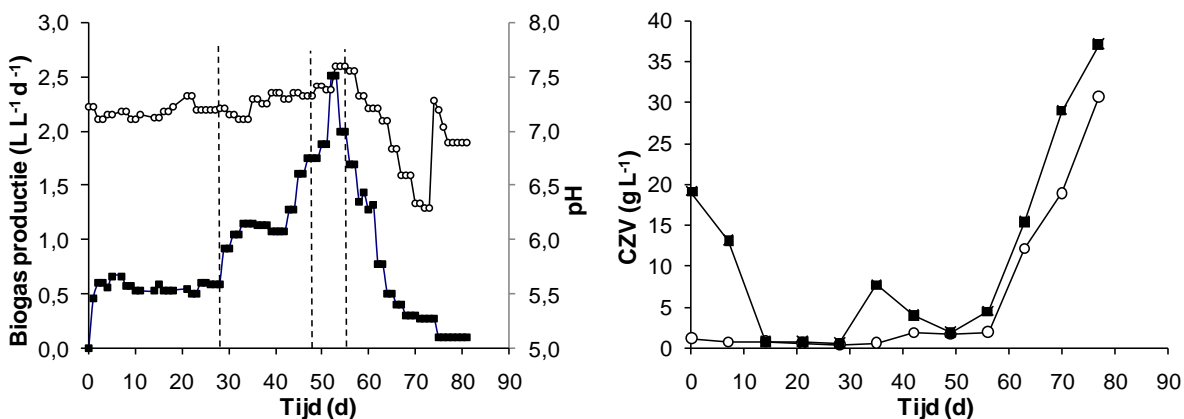
Voor ijzer, natrium en ammonium zijn de concentraties in beide reactoren ongeveer dezelfde. Nitraat, chloor, fosfaat en sulfaat zijn minder aanwezig in de controlereactor in vergelijking met de behandelingsreactor. Calcium komt in een hogere concentratie voor in de controlereactor.



Figuur 48: Resultaten controlereactor optimalisatie-effect ML
 Linkse grafiek: Biogasproductie (■) en pH (o), Rechtse grafiek: CZVt (■) en CZVs (o)



Figuur 49: Resultaten reactor behandeld met ML-A (Legende analoog aan Figuur 48)



Figuur 50: Resultaten reactor behandeld met ML-B (Legende analoog aan Figuur 48)

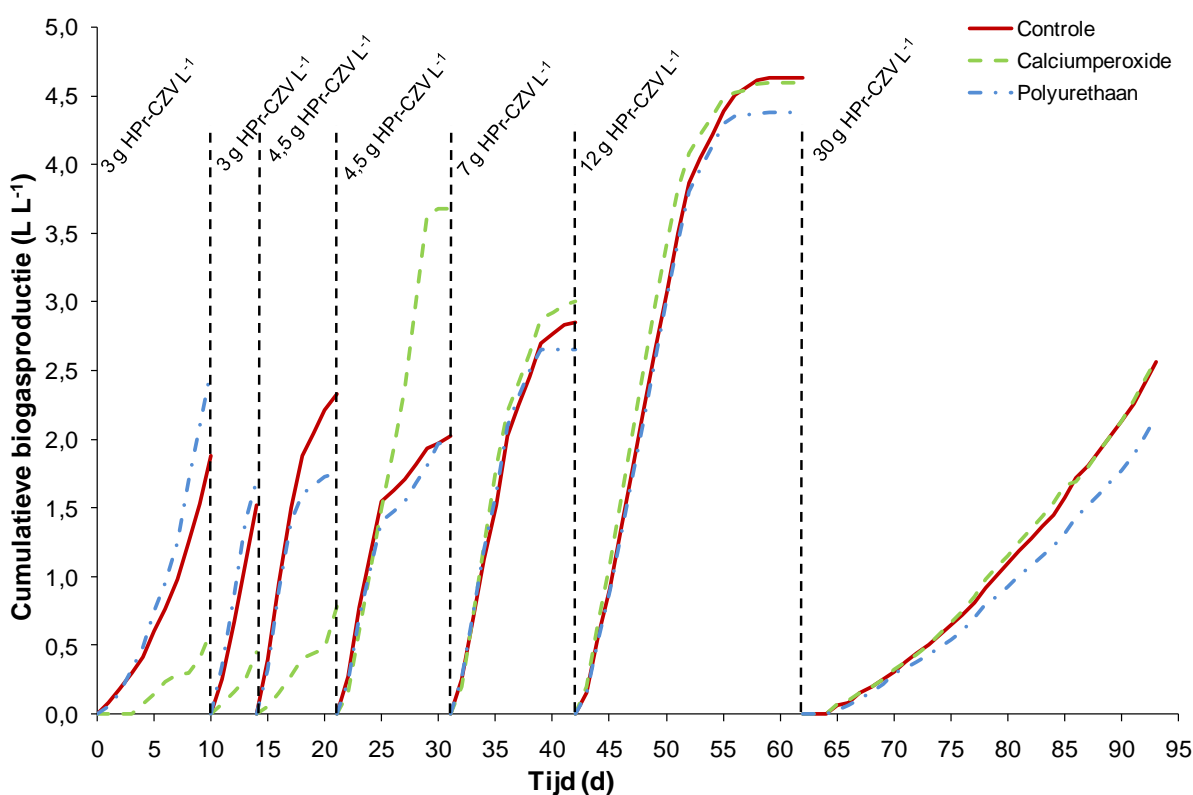
Zoals weergegeven wordt in Tabel 37, was de propionzuurconcentratie bij aanvang $0,02 \text{ g L}^{-1}$. In de reactoren met ML-dosering bleef deze waarde tussen $0,01$ en $0,07 \text{ g L}^{-1}$ tot dag 56. Daarna accumuleerde het propionzuur tot $4,1 \text{ g L}^{-1}$ op het einde van het experiment. In de controlereactor steeg de concentratie tot $0,23 \text{ g L}^{-1}$ op dag 21, waarna ze weer daalde tot $0,01 \text{ g L}^{-1}$ op dag 28 en constant bleef tot dag 49. Vanaf dan begon de propionzuurconcentratie te stijgen tot een finale concentratie van $4,2 \text{ g L}^{-1}$.

Tabel 37: Propionzuurconcentraties in batchreactoren optimalisatie-effect van ML (g L^{-1})

Dag	Controle	ML-A	ML-B
0	0,02	0,02	0,02
7	0,17	0,06	0,07
14	0,11	0,05	0,06
21	0,23	0,07	0,01
28	0,01	0,05	0,01
35	0,02	0,05	0,02
42	0,04	0,02	0,01
49	0,01	0,01	0,01
56	0,28	0,03	0,08
63	2,15		2,10
70	2,96		3,00
77	4,20		4,16

5.2 Micro-aeratie door calciumperoxide

Calciumperoxide werd op dag 1 en dag 10 toegevoegd om micro-aeratie in de anaerobe reactor te bekomen. Deze strategie bleek echter een negatieve invloed op de reactor te hebben, aangezien er minder biogasproductie was ten opzichte van de controlereactor (Figuur 51). In overeenstemming daarmee werd CZVs geaccumuleerd, waardoor er op dag 21 driemaal zoveel CZVs aanwezig was in de calciumperoxidereactor in vergelijking met de controlereactor. Daarom werd er beslist de dosering van calciumperoxide stop te zetten en de reactor als een extra controlereactor verder te zetten. Tot dag 31 was de biogasproductie hoger in deze reactor omdat de geaccumuleerde hoeveelheid CZVs verwerkt werd, maar vanaf dag 31 was de werking van deze reactor zeer gelijklopend met de controlereactor. De gedetailleerde CZVs en VVZ resultaten zijn niet opgenomen in dit eindwerk aangezien ze volledig overeenstemmen met de biogasproductie.



Figuur 51: Biogasproductie in de mesofiele reactoren met calciumperoxide en polyurethaan

5.3 Gereticuleerd polyurethaanschuim

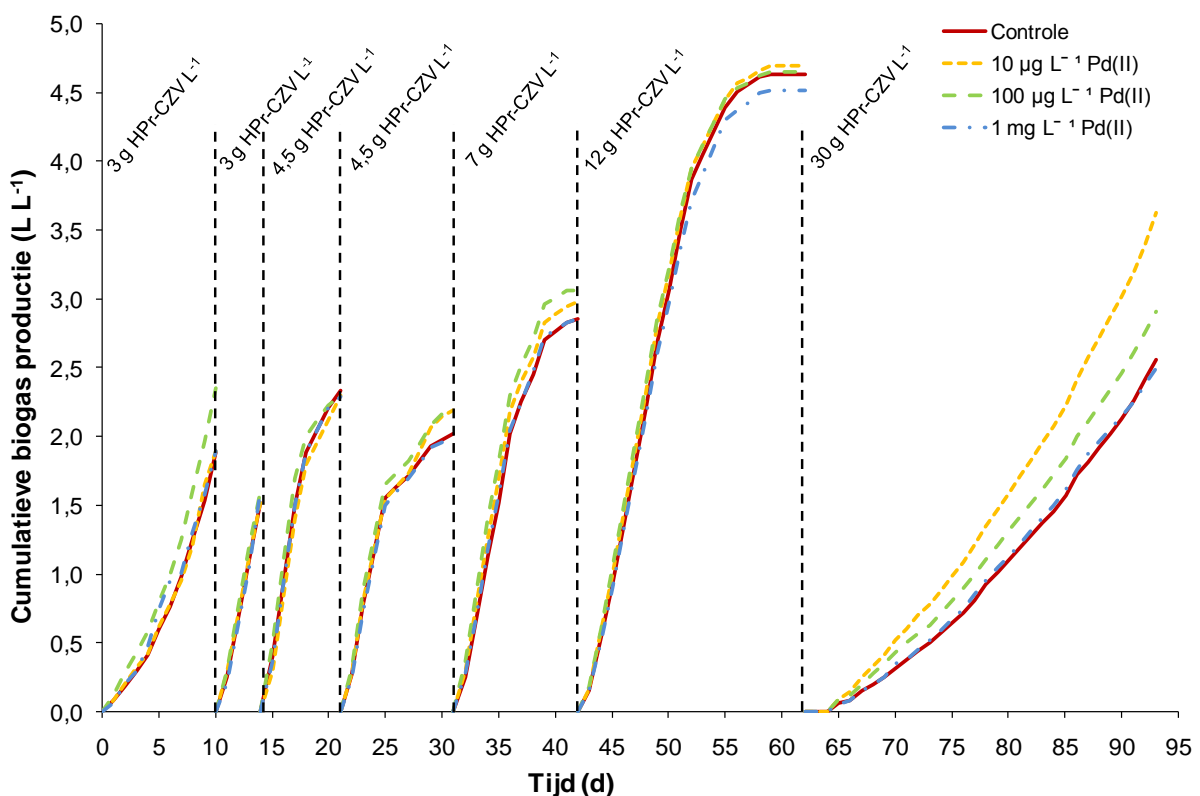
Om biomassaretentie in de reactor te bevorderen en de microbiële gemeenschap de kans te geven zich in een vaste structuur te nestelen, werd er gereticuleerd polyurethaanschuim toegevoegd aan de reactor. De biogasproductie is zeer gelijklopend met de controlereactor, kleine verschillen zijn te wijten aan overeenkomstige verschillen in CZVs toevoeging (Figuur 51).

5.4 Palladium

Om het effect van palladiumtoevoeging te onderzoeken, werd palladium gedoseerd in de vorm van het zout $\text{Na}_2\text{Cl}_4\text{Pd}$. De resultaten van deze test worden voorgesteld in Figuur 52.

Tot dag 62 was de biogasproductie in de verschillende reactoren zeer gelijklopend. De CZVs en VVZ concentraties werden op regelmatige basis gemeten, maar bevestigden enkel de conclusies uit de biogasresultaten en zijn daarom niet opgenomen in dit eindwerk. Als de verhouding biogasproductie ten opzichte van CZV verwijderingsefficiëntie werd bekeken, functioneerden alle reactoren ongeacht de dosis palladium even goed.

In de laatste periode daarentegen waarbij de reactoren een hoge belasting van 30 g HPr-CZV te verwerken kregen, trad er een significant verschil op. Hoe lager de dosis Pd(II), hoe sneller de reactor biogas produceerde. De reactoren met $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en $100 \mu\text{g L}^{-1}$ produceerden sneller dan de controlereactor. De totale hoeveelheid biogas die geproduceerd was op dag 93 was voor alle reactoren in verhouding met de hoeveelheid CZVs die verwijderd was. Bij alle reactoren duurde het tevens twee dagen alvorens de biogasproductie op gang kwam, want aanduidde dat de belasting hoog was voor de reactoren. Het biogas bevatte bij alle reactoren een hoge concentratie aan methaan, ongeveer 85%. Op dag 93 werd dit experiment beëindigd.

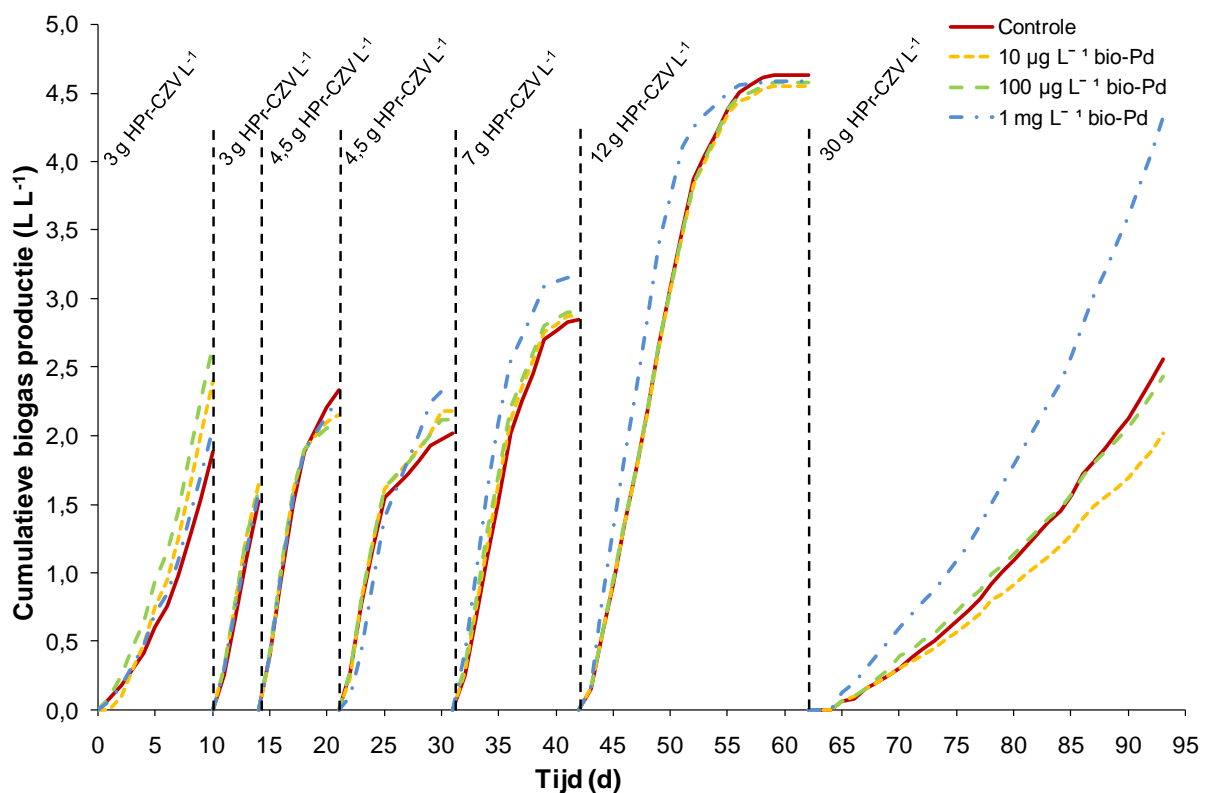


Figuur 52: Biogasproductie in mesofiele batchreactoren met palladium

5.5 Bio-palladium

Naast het experiment met palladium, werd hetzelfde experiment opgezet met analoge dosissen bio-palladium. Nanopartikels hebben ten eerste een hoog specifiek oppervlak en hoge reactiviteit, waardoor ze zeer geschikt zijn voor katalytische toepassingen (Hennebel et al., 2009). Een tweede reden om voor bio-palladium te opteren, is het feit dat bacterieel dragermateriaal nulwaardige nanopartikels stabiliseert. De biogasproductie tijdens dit experiment wordt gevisualiseerd in Figuur 53. De CZVs en VVZ concentraties zijn niet weergegeven in dit eindwerk aangezien ze volledig in overeenstemming waren met de biogasproductie.

Gedurende de eerste 60 dagen van het experiment werd het biogas in alle reactoren in ongeveer dezelfde mate geproduceerd, maar vanaf dag 21 werd in de reactor met 1 mg L^{-1} bio-Pd een iets snellere conversie waargenomen. In de laatste periode waarbij de reactoren belast werden met 30 g HPr-CZV, was in alle reactoren enkele dagen geen gasproductie en daarna produceerde de reactor met 1 mg L^{-1} bio-Pd met een grotere snelheid. De totale hoeveelheid biogas die geproduceerd was op dag 93 was in verhouding met de hoeveelheid CZVs die verwijderd was. Er werd een hoge methaanconcentratie van ongeveer 85% gemeten in het geproduceerde biogas.



Figuur 53: Biogasproductie in de mesofiele reactoren met bio-palladium

Deel V: Discussie

Hoofdstuk 1 Anaerobe vergisting van keukenafval

Vergisting kan zowel mesofiel als thermofiel toegepast worden, waarbij CSTR een vaak toegepast reactortype is voor industriële projecten voor verwerking van vast afval. Door te werken bij thermofiele temperatuur worden de reacties twee tot drie maal versneld in vergelijking met mesofiele reactoren en kan het reactorvolume daardoor beperkt blijven. Thermofiele reactoren zijn daarentegen gevoeliger voor veranderingen in omgevingsfactoren zoals temperatuur, waardoor het proces minder stabiel verloopt (Kuo en Cheng, 2007).

1.1 Controle versus behandeling

Bij vergelijking van de controlereactoren met OVB tussen 1 en 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹ en de reactoren waarbij de OVB stapsgewijs verhoogd werd van 1 tot 2,4 g CZV L⁻¹ d⁻¹, werd er duidelijk waargenomen dat de biogasproductie en de CZV verwijderingssnelheid stegen bij hogere OVB. DS en VS waarden waren eveneens hoger in de reactoren met hogere belasting. Tot slot werden er ook hogere concentraties aan propionzuur en totale en oplosbare CZV in het effluent gemeten op het moment dat de behandelingsreactoren een hogere OVB kregen toegediend dan de controlereactoren.

Maximale organische volumetrische belasting

De maximale OVB die bereikt kon worden met stabiele werking tot gevolg bij de uitgevoerde anaerobe vergisting van keukenafval in een C(S)TR-reactor met hydraulische verblijftijd van 18 dagen, lag in de grootte-orde van 2 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Dit komt overeen met 1,46 g VS L⁻¹ d⁻¹, een lage waarde in vergelijking met wat beschreven staat in literatuur. In het onderzoek van Hecht en Griehl (2009) was 2,6 g VS L⁻¹ d⁻¹ de maximale OVB, bij verdere verhoging werden de reactoren onstabiel. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de HRT 40 dagen was, wat dubbel zo lang is als in de reactoren van dit eindwerk. Bouallagui et al. (2005) rapporteerden als beste resultaat bij een HRT van 20 dagen een OVB van 2,6 g VS L⁻¹ d⁻¹. De universiteit van Southampton voerde in 2002 een gelijkaardige studie uit om mesofiele en thermofiele vergisting van keukenafval te vergelijken (Banks, 2003). Initieel was de hydraulische verblijftijd van de mesofiele vergister 31,5 dagen met een volumetrische belasting van 4,1 g VS L⁻¹ d⁻¹. Geleidelijk verminderde de HRT tot 20 dagen waardoor de volumetrische belasting steeg tot 5,72 g VS L⁻¹ d⁻¹. Door VVZ accumulatie en pH daling leidde deze hoge belasting echter tot falen van de reactor. De hoogste belasting bij de thermofiele reactor was 5,46 g VS L⁻¹ d⁻¹, wat de reactor deed falen. De thermofiele reactor kon dus niet dezelfde belasting bereiken als de mesofiele reactor. De accumulatie van inhiberende stoffen kan hier de oorzaak van zijn. Het verschil tussen de conclusies in dit

eindwerk en de resultaten beschreven in literatuur zijn vermoedelijk te wijten aan het verschil in samenstelling van het gebruikte keukenafval. Bovendien waren de hydraulische verblijftijden niet altijd identiek in de verschillende studies en dit heeft eveneens een grote invloed op de maximale organische volumetrische belasting.

Limiterende factoren

Er kunnen verschillende verklaringen naar voor geschoven worden voor de beperking in de OVB die anaerobe reactoren kunnen verwerken. Mogelijke limiterende factoren zijn biomassaconcentratie, massatransportsnelheid van substraat naar bacteriën of een accumulatie van inhiberende substanties zoals vetzuren en ammonium. Deze laatste verklaring was waarschijnlijk in de bestudeerde reactoren terug te vinden aangezien deze faalden bij een bepaalde maximale OVB. Kenmerkend voor proteïnerijk substraat zoals keukenafval is de hoge stikstofconcentratie die leidt tot hoge ammoniumconcentraties in de reactoren. Dit veroorzaakt een daling in de methanogene activiteit en affiniteit met een stijging van de residuele VVZ tot gevolg. Meer zelfs, deze VVZ gaan de hydrolyse en acetogenese vertragen, waardoor de ganse microbiële gemeenschap geïnhibeerd wordt (Angelidaki en Ahring, 1993).

Een tweede doorslaggevende factor voor het vroegtijdig falen van de reactoren in dit eindwerk is het feit dat er slechts één keer per dag gevoed werd. Kim et al (2002) vergeleken reactoren die in bedrijfsvoering enkel verschilden in het al dan niet continu voeden. De reactoren die continu gevoed werden konden een hogere OVB verwerken in vergelijking met de reactoren die slechts één maal per dag de voeding toegediend kregen. Leitão et al. (2004) gaven eveneens aan dat operationele variaties zoals voedingspulsen, pH- en temperatuurschommelingen een negatief effect hebben op de anaerobe vergisting.

Anionen- en kationenconcentraties

In de CSTR-reactoren gebeurde de bepaling van een aantal kationen en anionen op het einde van het experiment. Geen van deze ionen was in een inhiberende concentratie aanwezig. De OVB bleek geen invloed te hebben op de ijzer-, sulfaat- en chloorconcentratie in de reactor. Ijzer was slechts in zeer lage concentraties aanwezig ($0,2 \text{ mg Fe L}^{-1}$), net zoals sulfaat (ongeveer $2 \text{ mg SO}_4^{2-}\text{-S L}^{-1}$). Chloor was waarschijnlijk afkomstig van zout in het keukenafval ($548 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$). Bij vergelijking van de hoger belaste reactor met de controlereactor, kwamen volgende ionen in een hogere concentratie voor: calcium ($9,0 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$ ten opzichte van $2,1 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$), ammonium ($1090 \text{ mg NH}_4^{+}\text{-N L}^{-1}$ ten opzichte van $940 \text{ mg NH}_4^{+}\text{-N L}^{-1}$), nitraat ($12,8 \text{ mg NO}_3^{-}\text{-N L}^{-1}$ ten opzichte van $10,6 \text{ mg NO}_3^{-}\text{-N L}^{-1}$) en fosfaat ($127,4 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$ ten opzichte van $115,6 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$). Deze ionen zijn waarschijnlijk afkomstig van het keukenafval, aangezien de hoger belaste reactor meer keukenafval te verwerken kreeg. Natrium ($3708 \text{ mg Na}^{+} \text{ L}^{-1}$ ten opzichte van $3392 \text{ mg Na}^{+} \text{ L}^{-1}$) was meer aanwezig in de controlereactor dan in de behandelingsreactor. Dit is voornamelijk afkomstig van de hoeveelheden NaOH en NaHCO₃ die werden toegevoegd om respectievelijk pH en buffercapaciteit op het gewenste niveau te houden.

1.2 Mesofiel versus thermofiel

Als de resultaten van de thermofiele en mesofiele CTR-reactoren naast elkaar werden gelegd, waren de meeste parameters zeer gelijklopend, zoals residuele CZV concentraties, CZV verwijderingssnelheid en biogasproductie. De concentraties aan propionzuur en ammonium daarentegen waren niet gelijk voor de reactoren bij een verschillende incubatietemperatuur.

Propionzuurconcentraties

De propionzuurconcentraties waren beduidend hoger in de mesofiele reactoren. In periodes van goede reactorwerking was de concentratie $0,2 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ voor de thermofiele controlereactor ten opzichte van $1 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ voor de mesofiele controlereactor. Na falen van de reactor steeg de propionzuurconcentratie in de thermofiele controlereactor tot $3 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ in vergelijking met $6,5 \text{ g HPr-CZV L}^{-1}$ voor de mesofiele controlereactor. Zowel in periodes van goede werking als van falen was de concentratie in de mesofiele reactoren minstens dubbel zo groot als in de thermofiele reactoren. Dit is in tegenstelling tot de conclusies uit de literatuur waarbij in het algemeen de propionzuurconcentratie lager is bij mesofiele reactoren (Kim et al., 2002; Song et al., 2004). Song et al. (2004) rapporteerden een hogere propionzuurconcentratie in het thermofiele proces rond $1,2 \text{ g HPr L}^{-1}$ in vergelijking met $0,1 \text{ g HPr L}^{-1}$ in de mesofiele reactor. Dit was in overeenstemming met de oplosbare CZV concentraties. De omgekeerde waarneming in dit eindwerk kan wijzen op een hogere partiële waterstofgasdruk in de mesofiele reactoren, aangezien dit een voorname oorzaak van hoge propionzuurconcentraties is (Song et al., 2004).

Ammoniumconcentraties

De ammoniumconcentraties waren hoger in de thermofiele CTR-reactoren dan in de mesofiele CTR-reactoren, respectievelijk $1,1 \text{ g NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ en $0,7 \text{ g NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$. Dit stemt overeen met de conclusie van Omil et al. (1995) dat bij hogere temperatuur de totale ammoniumconcentratie hoger is in de reactoren.

1.3 CTR versus CSTR

Twee potentiële limiterende factoren voor de OVB in een CTR-proces werden geëlimineerd door de CSTR-bedrijfsvoering. Enerzijds werd er een beter contact verzekerd tussen substraat en micro-organismen door de implementatie van een mechanisch roersysteem. Anderzijds werd het uitwassen van biomassa verminderd doordat het effluent op een decanterende wijze afgelaten werd. De CSTR-reactoren werden onder mesofiele condities geïncubeerd.

Maximale OVB

De maximale OVB die bereikt kon worden met behulp van de mesofiele CSTR-reactoren was $2,4 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Deze resultaten waren in dezelfde grootte-orde als bij het CTR-proces. Veranderingen in reactordesign veroorzaakten in dit eindwerk dus geen significante optimalisatie van de anaerobe vergisting van keukenafval. Meerdere verklaringen kunnen aan de basis van deze bevinding liggen.

(1) Het is mogelijk dat de micro-organismen die essentieel zijn voor de verwerking van een hogere OVB nog steeds werden uitgewassen ondanks het decanteren van het effluent. In dit geval zou het toevoegen van dragermateriaal aan de reactor of een langere hydraulische verblijftijd verbetering kunnen brengen (Silva et al., 2006). (2) Een andere hinderpaal kan de gebrekkige hydrolyse van keukenafval zijn, waardoor het substraat niet goed verwerkt kon worden door het microbiële consortium. (3) Beperking van de OVB kan ook veroorzaakt worden door slechte samenwerkingsverbanden binnen de microbiële gemeenschap. In dat opzicht zou mengen van de reactor zelfs nadelig zijn. Deze opvallende vaststelling werd door Kim et al. (2002) ontdekt bij een vergelijkende studie met laboreactoren. Tijdens de opstartperiode vertoonden de gemengde reactoren (CSTR) minder stabiliteit dan de niet-gemengde reactoren (CTR) die een steady state bereikten in een korte tijd met een relatief stabiele pH en lage VVZ concentraties. In de steady state periode was het eveneens zichtbaar dat de thermofiele niet-gemengde reactor beter functioneerde in termen van lagere VVZ concentraties, hogere biogasproductie en VS verwijderingsefficiëntie. Dit bevestigde de hypothese dat een hechte microbiële gemeenschap de problemen van slechte effluentkwaliteit bij (thermofiele) systemen kan oplossen.

1.4 Evaluatie parameters falende reactoren

Wanneer resultaten uit literatuur vergeleken worden met de beschreven experimenten, kunnen enkele parameters geselecteerd worden om falende reactoren te karakteriseren.

pH

pH kan bekeken worden als een indicator voor de stabiliteit van een vergister aangezien de waarde afhankelijk is van de buffercapaciteit van het medium. De pH-waarde wordt beïnvloed door CO₂, VVZ en ammoniumconcentraties in het medium (Ripley et al., 1986). Een stijgende gasproductie wordt meestal vergezeld door een stijgende pH aangezien de methanogenese voor reductie van de VVZ zorgt.

Kim et al. (2002) gebruikten een minimum van pH 5,5 om een gezonde reactor te kenmerken. Monitoring van de pH is echter geen eenduidige methode om de status van de reactor af te leiden aangezien er een vertraging in de tijd is door de buffercapaciteit van de reactor. Bovendien werd in de experimenten van dit eindwerk de pH vaak op een constante waarde van 7,5 gehouden door middel van NaOH toevoeging, dus was dit niet de beste parameter om de reactorwerking te karakteriseren.

Biogas

In praktijk werd biogasproductie gebruikt om een eerste oordeel te vellen over de toestand van de reactoren, aangezien het de enige parameter is die naast de pH van de reactoren dagelijks onmiddellijk beschikbaar was. Biogasproductie als controleparameter bleek ook uit onderzoek een goede strategie te zijn om een stabiel proces te bekomen, omdat het een snelle weergave voorziet van de toestand van de reactor (Boe et al., 2008).

Naast de totale biogasproductie levert ook de samenstelling van het geproduceerde gas interessante informatie op. Wanneer de CO₂ concentratie in het biogas toeneemt, is dit eveneens een indicatie van een verstoorde vergisting (Deublein en Steinhauser, 2008). Deze parameter werd echter niet opgevolgd in het merendeel van de uitgevoerde experimenten.

Vrije vetzuren

De toxiciteit van VVZ wordt voornamelijk veroorzaakt door hun ongedissocieerde vorm die vrij door het celmembraan van de bacteriën kan getransporteerd worden. Als er vervolgens dissociatie van het vetzuur gebeurt in de bacteriële cel, dan zal de pH dalen waardoor de homeostase verstoord wordt (Boe et al., 2008). Bij een onstabiel anaeroob proces zal er accumulatie van VVZ optreden, waardoor deze een goede procesparameter zijn voor de detectie van procesverstoringen (Ahring et al., 1995; Nielsen et al., 2007).

In dit eindwerk werd de richtwaarde voor een inhiberende **propionzuurconcentratie** in de CTR- en CSTR-vergisters geschat op 3 g HPr-CZV L⁻¹ voor de mesofiele reactoren en 2 g HPr-CZV L⁻¹ voor de thermofiele reactoren. Dit is in overeenstemming met de literatuur waar Barredo et al. (1991) een kritisch interval definiëren tussen 1,5 en 2,5 g HPr-CZV L⁻¹. Boe et al. (2008) hebben op basis van de propionzuurconcentratie een automatisch controlesysteem ontwikkeld voor een mestverwerkende CSTR-reactor op laboschaal. Door online VVZ metingen, kon de propionzuurconcentratie gebruikt worden als controleparameter om de reactor stabiel te laten werken. Propionzuur is echter vrij persistent en reageert slechts traag op een corrigerende daling in OVB, wat leidde tot een sterke fluctuatie in biogasproductie als de propionzuurconcentratie als controleparameter gebruikt werd. Bij geleidelijke stijging van de OVB is het wel een goede parameter om te alarmeren in geval van overbelasting, maar het herstel van de reactor kan hier moeilijk op gebaseerd worden. Dit werd echter tegengesproken door Nielsen et al. (2007; 2008). In hun onderzoek werd geleidelijke normalisatie van de concentratie als pluspunt gezien bij gebruik van propionzuur als procesparameter. Bovendien werd er een goede relatie gevonden tussen de maximale afbraaksnelheid van propionzuur en de globale reactorwerking.

In literatuur werd een **azijnzuurconcentratie** groter dan 0,8 g HAc L⁻¹ aangehaald als inhiberend voor de anaerobe vergisting (Hill et al., 1987). Dit criterium gaat niet op voor de C(S)TR-reactoren. De azijnzuurconcentratie in de thermofiele CTR reactoren was in gezonde periodes tussen 0,6 en 3,2 g L⁻¹. Als de waarde tot meer dan 4 g L⁻¹ steeg, was er duidelijk sprake van een gefaalde reactor. De maximale waarde die bereikt werd, was 7 g L⁻¹ en 13 g L⁻¹ voor respectievelijk controle en behandelingsreactor. In gezonde mesofiele CTR-reactoren bleef de azijnzuurconcentratie beperkt tot 2 g L⁻¹, terwijl dit in gefaalde reactoren kon stijgen tot 10 g L⁻¹ voor de controlereactor en 12 g L⁻¹ voor de behandelingsreactor. In de mesofiele CSTR-reactoren varieerden de concentraties tussen 1,5 g L⁻¹ en 5,1 g L⁻¹ zowel voor controlereactor als voor de behandelde reactor.

De **totale VVZ concentratie** in thermofiel medium varieerde van 1 g L^{-1} tot 16 g L^{-1} voor de controlereactor en van 1 g L^{-1} tot 22 g L^{-1} voor de reactor met een stijgende OVB. Bij de mesofiele reactoren was het verschil tussen beide reactoren klein en lag de concentratie tussen 2 g L^{-1} en 24 g L^{-1} voor de CTR-reactoren en tussen 3 g L^{-1} en 9 g L^{-1} voor de CSTR-reactoren. Dit zijn lage concentraties in vergelijking met waarden gerapporteerd in de literatuur. Bij een gelijkaardige bedrijfsvoering en hetzelfde substraat, werd een concentratie van 7 g L^{-1} tot 28 g L^{-1} waargenomen in mesofiel medium en van 14 g L^{-1} tot 45 g L^{-1} in de thermofiele vergister (Banks, 2003). De grotere VVZ-variatie in de thermofiele vergisters is een indicatie van de onstabiele van de reactor. Uit dit eindwerk en de literatuur kan besloten worden dat verhoogde VVZ concentraties wijzen op een onstabiel proces. Bovendien werd bevestigd dat in het algemeen de effluentkwaliteit in termen van totale VVZ concentratie beter is bij de mesofiele reactoren in vergelijking met thermofiele reactoren (Kim et al., 2002; Banks, 2003; Song et al., 2004).

Alkaliniteit

Alkaliniteit is de buffercapaciteit van het medium die pH schommelingen kan opvangen. Dit kan bewerkstelligd worden door de aanwezigheid van hydroxiden, carbonaten, bicarbonaten van calcium, magnesium, natrium, kalium of ammonium in het digestaat. Vrije vetzuren kunnen eveneens bijdragen tot de alkaliniteit (Ripley et al., 1986).

De totale alkaliniteit van de thermofiele CTR-reactoren varieerde van $4,4 \text{ g L}^{-1}$ tot $8,4 \text{ g L}^{-1}$, terwijl de mesofiele alkaliniteit tussen $3,2 \text{ g L}^{-1}$ en $8,8 \text{ g L}^{-1}$ lag voor de CTR-reactoren en tussen $4,5 \text{ g L}^{-1}$ en 12 g L^{-1} voor de CSTR-reactoren. Deze concentraties waren hoger dan wat meestal gerapporteerd wordt in anaerobe vergisters, tussen 2 en 4 g L^{-1} (Speece, 2008). Een verklaring hiervoor kan gevonden worden in de hoge proteïneninhoud van keukenafval. Banks (2003) vond zelfs veel hogere alkaliniteitsconcentraties rond $16,4 \text{ g L}^{-1}$ en 13 g L^{-1} in respectievelijk thermofiele en mesofiele vergisters met een gelijkaardige bedrijfsvoering en substraat.

Ripley-index

De verhouding VVZ tot totale alkaliniteit wordt gemeten om de buffercapaciteit voor snelle pH-veranderingen te bepalen. De parameter kan benaderd worden door de bepaling van de Ripley-index via een titratie. Zoals voorgesteld was door Ripley et al. (1986) kwam in de mesofiele CSTR-reactoren een waarde van 0,35 of lager overeen met een goede vergisting met voldoende buffercapaciteit. Wanneer de waarde groter werd dan 0,35, duidde dit op een falende of gefaalde reactor.

1.5 Besluit: Anaerobe vergisting van keukenafval

In deze eerste reeks van experimenten is naar voor gekomen dat anaerobe CTR-reactoren die keukenafval behandelen gevoelig zijn voor veranderingen in de OVB. De maximale OVB die bekomen werd in de laboreactoren was in de grootte-orde van $2 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Na veranderingen in reactor design werden gelijkaardige resultaten behaald. Door de meting van de ammoniumconcentraties werd bevestigd dat het falen van de reactoren niet aan een te hoge ammoniumconcentratie te wijten waren, aangezien de waarden onder de toxische grens bleven (Gerardi, 2003). Dit was eveneens het geval voor de bestudeerde ionenconcentraties. Het feit dat de reactoren slechts één keer per dag gevoed werden in plaats van een meer continue voedingstoevoer, zou aan de basis van het snelle falen van de reactoren kunnen liggen (Kim et al., 2002; Leitão et al., 2004). Tevens zou het verlengen van de hydraulische verblijftijd het mogelijk maken om een hogere organische volumetrische belasting te bereiken. Tot slot werd eveneens een gebrekkige hydrolyse van het keukenafval of het uitwassen van essentiële micro-organismen aangehaald als potentiële limiterende factoren.

Ripley-index, propionzuurconcentratie en biogasproductie waren de beste parameters om de reactors te karakteriseren, maar de voorspellende waarde was beperkt.

Aangezien zowel mesofiele als thermofiele reactoren vergelijkbare resultaten bekwamen, werd het mesofiele temperatuursbereik als het beste alternatief verkozen. Deze strategie vereist immers minder opwarmingsenergie voor het influent.

Hoofdstuk 2 Microbiële analyses

2.1 Microbial resource management

Doorbraken in microbiologie hebben een grote diversiteit aan microbiële grondstoffen ter beschikking gesteld. Het doel is nu om deze grondstoffen goed te beheren zodat hun mogelijkheden ten volle ontwikkeld worden. Deze uitdaging zit vervat in de term 'microbial resource management' (MRM) naar analogie met 'human resource management' (Verstraete et al., 2007). De aspecten die daarbij bestudeerd worden handelen over welke organismen aanwezig zijn, hoe ze samenwerken en hoe ze gecontroleerd kunnen worden. De parameters rijkheid, functionele organisatie en dynamica worden gebruikt om de MRM-aspecten te karakteriseren.

Rijkheid

Aan de hand van het DGGE-patroon kan de rijkheid van de microbiële gemeenschap bepaald worden. Dit kan tevens gecorreleerd worden met de karakteristieken van het bestudeerde milieu. In een gunstige omgeving kan een grote verscheidenheid aan micro-organismen overleven, wat zich zal weerspiegelen in een grote genetische variabiliteit. In dit geval is er een brede denaturerende gradiënt nodig om de totale microbiële diversiteit te beschrijven. Aan de andere kant zal in een ongunstig of zeer specifiek milieu het aantal species dat kan overleven veel kleiner zijn. Dit resulteert in een smallere denaturerende gradiënt die door de microbiële gemeenschap wordt bedekt (Marzorati et al., 2008).

Functionele organisatie

In een Lorenz-curve wordt de cumulatieve relatieve bandintensiteit van een DGGE-patroon geplotted opzichte van het cumulatief aantal banden. De intensiteit van een band is een maat voor de hoeveelheid aanwezig DNA en is dus representatief voor de hoeveelheid bacteriën per band. Alle micro-organismen die in één band gebundeld zitten, worden betiteld als een operationele taxonomische eenheid (OTU) (Muyzer et al., 1993). De Lorenz-curven geven op die manier visueel weer in welke mate de numerieke aanwezigheid van bacteriën evenredig verdeeld is over de verschillende species. In een continue reactor worden niet-functionele micro-organismen uitgespoeld, zodat er gesteld mag worden dat elke aanwezige bacterie werkelijk actief is in de microbiële gemeenschap. Daarom kan er besloten worden dat de Lorenz-curven ook een indicatie geven van de relatieve hoeveelheid werk die door een bepaald percentage van de species verricht wordt.

De Italiaanse econoom Vilfredo Pareto (°1848) postuleerde dat 20% van de bevolking 80% van de rijkdom bezit. Bij uitbreiding van deze theorie naar de microbiële wereld wordt er verondersteld dat een dergelijk verband eveneens geldig is en zelfs gewenst als het op werkverdeling aankomt (Verstraete et al., 2007). De optimale verhouding is afhankelijk van het type biotoop, maar algemeen kan gesteld worden dat de gulden middenweg de beste optie is. Bij een zeer onevenredige verdeling heerst er een te sterke specialisatie. Als de condities nadelig worden voor de overheersende specialisten, dreigt de microbiële gemeenschap stil te vallen.

In het andere extremum is de taakverdeling perfect evenredig, maar dit houdt gevaren in door een te beperkte organisatie en selectie. De F_{20} is een parameter die aangeeft hoeveel werk er verricht wordt door meest actieve 20% van de microbiële gemeenschap. Een andere parameter om de taakverdeling te karakteriseren is de Gini-coëfficiënt die het oppervlak weergeeft dat gelegen is onder de curve ingesloten door de Lorenz-curve en de 45° lijn van perfect evenredige verdeling. Een lage Gini-coëfficiënt duidt op een meer gelijke verdeling, perfecte gelijkheid komt overeen met Gini-coëfficiënt 0. Hoe dichter de Gini-coëfficiënt 1 benadert, hoe meer de verdeling ongelijk is. In dit eindwerk werd de Gini-coëfficiënt gebruikt om de functionele organisatie uit te drukken, maar de conclusies zijn analoog als met de F_{20} -waarde wordt gewerkt.

Dynamica

De hypothese is dat een goede microbiële gemeenschap over de tijd veranderingen nodig heeft, maar dat deze niet te groot mogen zijn om de stabiliteit en functies van de microbiële gemeenschap niet in het gedrang te brengen (Marzorati et al., 2008). Dit wordt nagegaan met behulp van een “moving window” analyse, waarbij er voldoende aandacht moet besteed worden aan het bepalen van een representatief tijdsinterval om de dynamica te beschouwen.

2.2 Bacteria

Mesofiel versus thermofiel

De uitgevoerde clusteranalyse bracht zoals verwacht duidelijk aan het licht dat de thermofiele reactoren een andere microbiële gemeenschap bevatten dan de mesofiele reactoren. Dit werd als uitgangsbasis gebruikt voor verdere experimenten. Door zowel bij thermofiele als bij mesofiele condities reactoren te incuberen, werd een grote verscheidenheid aan bacteriën bereikt.

Als de thermofiele en mesofiele CTR-reactoren met elkaar vergeleken werden, was de rijkheid bij de thermofiele reactoren lager dan bij mesofiele reactoren in gelijkaardige condities. Levén et al. (2007) kwamen in hun onderzoek tot eenzelfde conclusie en benadrukten eveneens dat de thermofiele reactoren ondanks de lagere rijkheid hetzelfde prestatieniveau konden bereiken als de mesofiele reactoren. De dynamica was hoger voor de thermofiele CTR-reactoren (46% tot 83%) dan voor de mesofiele reactoren (8% tot 72%). Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat er in de thermofiele reactoren minder species aanwezig waren. Daardoor hadden veranderingen van bepaalde species een grotere inpak op de totale reactor dan bij de mesofiele reactoren.

Constante versus stijgende OVB

De microbiële gemeenschap in de **thermofiele** reactoren veranderde naarmate de reactoren langer werkzaam waren, maar het verschil tussen de controle reactor en de reactor behandeld met een grotere OVB was beperkt. De Gini-coëfficiënt van de controlereactor bleef gelijk. De Gini-coëfficiënt van de reactor met hogere OVB kende een kleine daling wat aangeeft dat de gemeenschap een meer gelijke verdeling kreeg.

Bij de **mesofiele** reactoren was de Gini-coëfficiënt algemeen genomen lager bij de controlereactor dan bij de reactor met hogere OVB. Dit wijst op een evenwichtiger aanwezigheid van de verschillende bacteriën als de reactor aan minder verstoringen onderhevig is.

Rincón et al. (2008) namen een hoger aantal *Bacteria* fylogtypes waar bij stijgende volumetrische belasting. Deze trend was zo uitgesproken bij hen doordat ze een ander substraat gebruikten dan keukenafval, waardoor de OVB verhoogd kon worden van 0,8 g CZV L⁻¹ d⁻¹ tot 11,0 g CZV L⁻¹ d⁻¹. Waarschijnlijk ligt hierin de verklaring dat er bij de experimenten in dit eindwerk geen duidelijke trend in de rijkheid naargelang de OVB werd waargenomen. Het bereik waarover Rincón et al. (2008) oordeelden, was veel groter dan in dit eindwerk waar de OVB varieerde van 1,2 tot 3,5 g CZV L⁻¹ d⁻¹, met een maximale OVB voor goede werking van de reactoren bij 2,4 g CZV L⁻¹ d⁻¹.

Goed werkende versus gefaalde reactor

Als de **thermofiele** stalen van goede reactorperformantie (dag 54) en gefaalde reactoren (dag 86) vergeleken werden, vertoonden de microbiële gemeenschappen een grote overeenkomst. De Gini-coëfficiënt was bij de reactor met hogere OVB lager als de reactor verziekt was. De rijkheid was zowel voor de controlereactor als voor de zwaarder belaste reactor hoger wanneer de reactoren faalden. Waarschijnlijk bood deze stress-situatie de mogelijkheid tot ontwikkeling aan nieuwe organismen die daarvoor in onvoldoende hoeveelheid aanwezig waren om aan de detectielimiet van de DGGE techniek te voldoen (1% van de totale hoeveelheid DNA) (Marzorati et al., 2008). Wittebolle et al. (2009) toonde aan dat een evenredig verdeelde gemeenschap beter tegen stress bestand is. Bij hoge gelijkheid is de kans immers groter dat er een species in voldoende mate aanwezig is dat bestand is tegen een bepaalde verstoring. Bij een lage gelijkheid is er meer kans dat de gemeenschap stilvalt als de dominerende species geen weerstand kunnen bieden tegen de verstoring.

De stalen van de **mesofiele** CTR-reactoren waren genomen toen de reactoren al aan het falen waren. Bij de CSTR-reactoren was het verschil beter te bepalen: de stalen van dag 133, 153 en 169 waren afkomstig van gezonde reactoren, terwijl de reactoren op dag 183 verziekt waren. Bij de controlereactor nam de Gini-coëfficiënt af en de rijkheid toe als de reactor faalde naar analogie met de thermofiele CTR-reactoren. Bij de mesofiele reactor die zwaarder belast werd, is er een tegengesteld effect zichtbaar: de Gini-coëfficiënt nam toe en de rijkheid nam af bij het falen van de reactor. Dit betekent dat de microbiële gemeenschap verslechtert, wat de kans op spontaan herstel verkleint.

CTR versus CSTR

Bij de mesofiele reactoren had het roeren van de reactor en de decanterende manier van effluent nemen een betekenisvolle invloed op de microbiële gemeenschap, want de cluster van de CSTR-reactoren onderscheidde zich van de stalen van de CTR-reactoren (samen met het eerste staal bij opstart van de CSTR-reactoren). Bij de CSTR-reactoren was er tevens een verschil in microbiële gemeenschap bij vergelijking van de controlereactor en de reactor belast met een hogere OVB.

De CSTR-reactoren hadden een lagere Gini-coëfficiënt en een hogere rijkheid. Door het roeren en de decanterende manier van effluent-name, ontstond er een rijkere microbiële gemeenschap die meer in evenwicht was.

Voor het thermofiele temperatuurbereik kan er geen vergelijking gemaakt worden tussen het CTR- en CSTR-proces aangezien er geen thermofiele CSTR-reactoren werden opgestart in dit eindwerk.

Correlatie microbiële parameters met industriële reactorparameters

Een hogere Gini-coëfficiënt en een lagere rijkheid hadden een lagere biogasproductie tot gevolg. De correlatie tussen de microbiële parameters en de biogasproductie had echter een kleine R^2 -waarde (deze grafieken zijn niet opgenomen in het Resultaten gedeelte). Dit is te verklaren doordat de DGGE-patronen afkomstig waren van *Bacteria* die niet rechtstreeks betrokken zijn bij de methaanvormende stap aangezien het *Archaea* zijn die de methanogenese uitvoeren. Waarschijnlijk is er een vertraging in de tijd op dit verband, aangezien *Bacteria* acetaat en waterstof produceren dat nadien verbruikt wordt door *Archaea*. Indien de bacteriële gemeenschap faalt, zal de methaanvorming dus enige tijd later eveneens stilvallen.

Een veelbelovende bevinding was de correlatie tussen de microbiële parameters en de Ripley-index. Een lage Gini-coëfficiënt en een hoge rijkheid kwamen overeen met een lage Ripley-index (indicator voor een goed functionerende reactor). In de grafieken was er één uitschieter (staal 14 CSTR C dag 183). Als deze buiten beschouwing werd gelaten, werd een R^2 -waarde bekomen van 0,85 voor beide trendlijnen.

Algemeen gesproken kan er besloten worden dat een goede Ripley-index wijst op een evenwichtige microbiële gemeenschap die optimaal werkt. Een slechte Ripley-index komt overeen met een falende samenwerking tussen de micro-organismen. Op die manier lijkt het bepalen van de microbiële parameters dus geen extra informatie aan te leveren, aangezien het steeds een bevestiging is van de reactorparameters die veel sneller te bepalen zijn.

De uitschieter op de grafiek kan wel aanleiding geven tot een belangrijke meerwaarde van het bepalen van de microbiële parameters. De reactor was op het moment van staalname net aan het falen, maar de Gini en rijkheid van het microbiële consortium waren nog steeds in orde. De reactor werd vrij snel hierna stopgezet, maar misschien zouden de goede microbiële parameters de sleutel kunnen zijn tot een spontaan en snel herstel in de reactor. Dit is een interessante aanwijzing die verder onderzocht vereist. In het geval dat een slechte Ripley-index gepaard gaat met microbiële parameters die aanvaardbaar zijn, dan zou het wachten op spontaan herstel verantwoord zijn. Als de slechte Ripley-index bevestigd wordt door een falende microbiële gemeenschap, zou dit aangeven dat spontaan herstel weinig waarschijnlijk is. Externe acties zijn in dat geval vereist. Aan de andere kant zou een goede Ripley-index die tegengesproken wordt door slechte microbiële parameters kunnen leiden tot een vroegtijdige detectie van een falende reactor, waardoor er tijdig ingegrepen kan worden. Dit zijn echter nog hypothesen die verder onderzoek vereisen.

2.3 *Archaea*

Mesofiel versus thermofiel

De clusteranalyse voor *Archaea* was minder duidelijk dan de bacteriële analyse. Vier van de vijf thermofiele stalen clusterden samen, maar één thermofiel staal zat in een mesofiele cluster. De *Archaea* gemeenschap kende dus een grotere overeenkomst in thermofiele en mesofiele reactoren dan voor *Bacteria* was waargenomen. De rijkheid kon niet voor alle thermofiele stalen bepaald worden, maar globaal gezien was deze in thermofiele reactoren lager (0 tot 0,8) dan in mesofiele reactoren (0 tot 3,52), net zoals bij *Bacteria*.

Constante versus stijgende OVB

In de mesofiele reactoren was de Gini-coëfficiënt gelijkaardig voor de controlereactor en de behandelingsreactor. Naarmate de tijd vorderde, daalde de Gini-coëfficiënt in beide reactoren in dezelfde mate. Voor de rijkheid werd er een invloed van de OVB opgemerkt. Bij de reactor belast met een hogere OVB was de rijkheid groter dan in de controlereactor. Voor thermofiele reactoren kon deze vergelijking niet gemaakt worden wegens het ontbreken van voldoende gegevens.

Goed werkende versus gefaalde reactor

Op dag 133, 153 en 169 waren de CSTR-reactoren in goede conditie, maar op dag 183 waren de reactoren verziekt. Zowel in de controlereactor als in de behandelde reactor nam de Gini-coëfficiënt af en de rijkheid toe als de reactor faalde. Voor de CTR-reactoren was er onvoldoende informatie beschikbaar om een vergelijking te maken tussen periodes van goed functioneren of falen.

CTR versus CSTR

De Gini-coëfficiënt was hoog en de rijkheid laag in de mesofiele CTR-reactoren in vergelijking met de mesofiele CSTR-reactoren. Ondanks het feit dat het niet mogelijk was om een hogere OVB te bereiken, doet deze waarneming vermoeden dat het CSTR-proces een positieve invloed had op de microbiële gemeenschap.

Correlatie microbiële parameters met industriële reactorparameters

Er was geen correlatie tussen de microbiële parameters en de biogasproductie of Ripley-index. Tussen de microbiële parameters onderling werd daarentegen een significante correlatie teruggevonden. Gini-coëfficiënt en rijkheid waren negatief gecorreleerd met een R^2 -waarde van 0,94. Dit is te verklaren doordat de stalen met een lage rijkheid vaak maar één of twee dominante *Archaea* species hadden, waardoor de Gini-coëfficiënt naar ongelijkheid neigde.

2.4 *Archaea* versus *Bacteria*

De rijkheid in de *Archaea* gemeenschap was veel lager dan bij de *Bacteria*. Methanogenese gebeurt door zeer gespecialiseerde micro-organismen, waardoor de rijkheid beperkt is. Hydrolyse en acetogenese zijn reacties die door een breed spectrum aan micro-organismen kunnen uitgevoerd worden, met een grotere rijkheid tot gevolg. De dynamica bij de *Archaea* was lager dan bij de *Bacteria* werd waargenomen. Dit was in overeenstemming met de vaststelling van Rincón et al. (2008) dat de *Archaea* gemeenschap een meer statische samenstelling heeft. Functionele organisatie binnen de gemeenschappen evolueerde sterker bij de *Archaea* aangezien de Gini-coëfficiënt over een groter bereik varieerde. Wederom kan hiervoor een verklaring gevonden worden in het feit dat de *Archaea* gemeenschap een lagere rijkheid had, waardoor kleine verschillen in abundantie een grotere invloed hebben op de functionele organisatie.

2.5 Besluit: Microbiële analyses

Mesofiele reactoren bevatten een rijkere en meer dynamische microbiële gemeenschap dan thermofiele reactoren, zowel wat *Bacteria* als *Archaea* betreft.

Bij een hogere organische volumetrische belasting was de Gini-coëfficiënt in de meeste reactoren lager, wat erop wijst dat de species meer in evenwicht zijn als de reactor aan meer stress in de vorm van een hoge belasting onderhevig is. De rijkheid van de gemeenschap, voornamelijk bij de *Archaea*, was hoger bij een hogere OVB.

In CSTR-reactoren was de Gini-coëfficiënt lager en de rijkheid hoger dan in CTR-reactoren, wat aangeeft dat door het mengen en de decantatie van het effluent een rijkere microbiële gemeenschap ontstond die meer in evenwicht was. In het DGGE-patroon voor *Bacteria* verscheen een nieuw species door de CSTR-bedrijfsvoering.

Een lage Gini-coëfficiënt en een hoge rijkheid voor *Bacteria* kwamen overeen met een lage Ripley-index (indicatie van een goed functionerende reactor). Deze correlatie werpt een vernieuwende blik op het verband tussen de microbiële parameters voor *Bacteria* en de Ripley-index. Een goede Ripley-index impliceert een goed werkende bacteriële gemeenschap, terwijl een slechte Ripley-index overeenkomt met een falende samenwerking tussen de micro-organismen. De microbiële parameters bevestigen in dit opzicht de conclusies op basis van de Ripley-index.

Verder onderzoek is noodzakelijk om de gestelde hypothese te staven dat microbiële parameters een meerwaarde kunnen leveren door de evolutie van de reactor te voorspellen. Spontaan herstel van een reactor met een slechte Ripley-index zou aangekondigd worden door goede microbiële parameters. Externe acties om het herstel te bewerkstelligen zouden dan enkel nodig zijn indien de microbiële analyse een slechte gemeenschap aangeeft. Een falende reactor zou bovendien vroegtijdig gedetecteerd kunnen worden als een goede Ripley-index gepaard gaat met slechte microbiële parameters.

Hoofdstuk 3 Herstel van gefaalde reactoren

3.1 Ijzersulfaat

In het uitgevoerde experiment had ijzersulfaat geen versnellend effect op het herstel van gefaalde reactoren. Ijzersulfaat kreeg daarentegen in literatuur een positief effect toegeschreven bij dagelijkse toevoeging aan goed werkende reactoren ter verhoging van de methanogenese en de substraatconversiesnelheid (Rao en Seenayya, 1994). Waarschijnlijk was in het uitgevoerde experiment binnen dit eindwerk de microbiële gemeenschap in de reactoren reeds te zwaar beschadigd om nog een voordeel te halen uit het ijzersulfaat. Bovendien was de geaccumuleerde dosis (3,2 mM over 40 dagen) kleiner dan de dosis beschreven in literatuur (20 tot 50 mM) (Rao en Seenayya, 1994). Het exacte werkingsprincipe van ijzersulfaat moet nog verder onderzocht worden.

3.2 Micronutriënten

Mesofiele reactoren

Bij de mesofiele reactoren duurde het 24 dagen alvorens de biogasproductie op gang kwam. De reactoren die dagelijks een boost-dosis ML en wekelijks een default-dosis ML toegediend kregen, vertoonden een iets hogere biogasproductie, maar verschillen waren minimaal. In combinatie met de gegevens omtrent CZV- en VVZ-concentraties kan besloten worden dat de dosering van ML geen versnellende invloed had op het herstel van de reactoren.

Thermofiele reactoren

Deze bevinding werd bevestigd in de thermofiele reactoren. Bij alle reactoren kwam met eenzelfde snelheid de biogasproductie op gang en stagneerde deze productie na 30 dagen rond 7 L. Uitzondering was de reactor die initieel wekelijks een boost-dosis ML toegediend kreeg. Tot dag 27 kende de biogasproductie eenzelfde verloop als in de andere reactoren, maar deze reactor bleef biogas produceren tot 10,5 L op dag 48 wanneer dit experiment werd beëindigd. Geen van de ML toevoegingen had dus een versnellend effect op het herstel van de reactoren, maar de wekelijks boost gedoseerde reactor vertoonde een blijvende CZV verwijdering terwijl de andere reactoren al gestopt waren met vergisten. De wekelijkse boost-dosis heeft dus een positieve invloed op de reactor in die zin dat de microbiële gemeenschap langer actief bleef zodat de residuale CZV concentratie op het einde van het experiment lager was. Dit doet vermoeden dat de micro-organismen beter gestimuleerd worden door het toevoegen van een grote dosis biobeschikbare nutriënten dan wanneer dezelfde dosis geleidelijk werd toegevoegd (dagelijkse boost-dosis).

3.3 Ammoniumverwijdering

Ammoniumverwijdering met behulp van PDMS-membranen is zeer beperkt. Het benodigde oppervlak om 50% verwijdering te bekomen indien 1 g vrij ammoniak L⁻¹ aanwezig is in de reactor, is 3450 m² m⁻³. Dit is te veel om in een reactor te brengen. In praktijk is een membraanoppervlak van 100 tot 200 m² m⁻³ de maximale hoeveelheid die geïmplementeerd kan worden in een reactor die afvalwater behandelt (Downing et al., 2009). Door de vorming van biofilm en de vaste stoffen in de reactor kunnen de membraanvezels immers aan elkaar gaan kleven en zo het contactoppervlak met de vloeistof verkleinen. Bovendien wordt de energie nodig voor mengen van de reactorinhoud en verwijderen van de overtollige biomassa dan veel te groot.

Een betere optie zou het gebruik van een membraan contactor met microporeuze hydrofobe membranen zijn (Hecht et al., 1990). Downing et al. (2009) gebruikten een dichtheid van 130 m² m⁻³ in hun onderzoek naar stikstofverwijdering met holle vezels. De toepasbaarheid voor vermindering van ammoniumtoxiciteit dient dus ook grondig onderzocht te worden.

Ammoniumtoxiciteit blijft een actueel onderwerp en wordt frequent waargenomen in praktijk. Het substraat onder controle houden en vroege detectie van de inhibitie blijft tot nu toe de beste manier om economische verliezen te minimaliseren. Wanneer de ammoniumtoxiciteit onvermijdelijk is, geeft verdunnen van het influent met eenvoudig degradeerbaar substraat, zoals verse mest, een hoge methaanproductie in de herstelperiode (Nielsen en Angelidaki, 2008). Als de verdunning gebeurt met verse biomassa, zoals reeds vergiste mest, dan wordt een evenwichtige herstel bekomen met minimale schommelingen in VVZ-concentraties.

3.4 Besluit: Herstel van gefaalde reactoren

Ijzersulfaat had geen versnellend effect op het herstel van gefaalde reactoren, maar kan daarentegen een optimalisatie teweeg brengen door hogere biogasproductie in goed functionerende reactoren (Rao en Seenayya, 1994). Micronutriënten versnelden het herstel van de biogasproductie niet in de bestudeerde gefaalde reactoren, maar een wekelijkse boost-dosis had een bevorderend effect in de zin van een lagere finale CZV concentratie in de reactor. Een theoretische berekening toonde aan dat PDMS-membranen slechts een beperkte capaciteit hebben om ammoniumtoxiciteit te verlagen. Het in situ herstellen van gefaalde reactoren blijft dus een belangrijke doelstelling voor toekomstig onderzoek.

Hoofdstuk 4 Optimalisatie van anaerobe vergisting

4.1 Micronutriënten

Er werden geen grote verschillen in biogasproductie waargenomen tussen de reactoren met verschillende samenstellingen van ML. Met of zonder ML faalde de biogasproductie in de reactoren bij eenzelfde OVB.

In een experiment beschreven door Kim et al. (2002) was toevoegen van nutriënten zoals Ca, Fe, Ni en Co noodzakelijk wanneer de VVZ concentratie steeg om een goede reactorwerking te behouden. Dit wijst op het belang van biobeschikbaarheid van nutriënten. Hoewel het gebruikte substraat (hondenvoeder in het beschreven geval) van nature reeds een uitgebreide samenstelling aan nutriënten bevatte, had toevoegen van nutriënten een positief effect op zowel de mesofiele als de thermofiele reactoren. Dit toonde aan dat er wel degelijk een tekort was aan biobeschikbare nutriënten, waarschijnlijk gelimiteerd door precipitatiereacties (Kim et al., 2002).

Het toevoegen van ML had geen invloed op de concentraties aan ijzer, natrium en ammonium in de reactoren, aangezien deze in dezelfde concentratie voorkwamen in de controlereactor en in de reactor behandeld met ML-B. De concentraties waren respectievelijk $0,6 \text{ mg Fe L}^{-1}$, $3100 \text{ mg Na}^+ \text{ L}^{-1}$ en $1900 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$. Hoewel er ijzer aanwezig is in ML, was dit niet in een hogere dosis terug te vinden in de behandelde reactor. Dit kan wijzen op volledige opname van het toegevoegde ijzer. De invloed van ML op ammoniumafbraak was miniem, aangezien de hoeveelheid in beide reactoren nog dezelfde waren. Nitraat, chloor, fosfaat en sulfaat waren in hogere concentraties aanwezig in de reactor behandeld met ML. Chloor was afkomstig van de ML bestanddelen FeCl_3 en CoCl_2 . Nitraat, fosfaat en sulfaat waren waarschijnlijk aanwezig in ML door het gistextract waaruit dit samengesteld is. Een mogelijke oorzaak voor het uitblijven van een significant effect van de ML zou zijn dat de concentraties die van nature aanwezig zijn in het keukenafval al voldoende biobeschikbaar waren om de micro-organismen te voorzien van micronutriënten.

In alle reactoren, tevens in de controlereactor, werd een OVB van $3 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bereikt, wat aantoonde dat deze reactoren een betere werking kenden dan de CTR- en CSTR-reactoren uit de eerste experimenten van dit eindwerk. Vanaf $4 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ faalde de biogasproductie. Extra factoren in de limitatie van de OVB in de C(S)TR-reactoren kunnen daardoor de opschaling van het proces en massatransfer-limitaties zijn, aangezien de ML-reactoren slecht 2 L groot waren ten opzichte van 18 L voor de C(S)TR-reactoren.

4.2 Micro-aeratie door calciumperoxide

Micro-aeratie wordt in de literatuur beschreven als een doeltreffende manier om de productie van H_2S te onderdrukken zonder de methaanproductie negatief te beïnvloeden (Tang et al., 2004). Calciumperoxide was in dit eindwerk geen goede strategie om micro-aeratie te bekomen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de sterke oxidatieve capaciteit van calciumperoxide waardoor het biomassa deels afbreekt bij regelmatige toevoeging. Dit zorgde voor inhibitie van de biogasproductie en verklaarde de accumulatie van CZV die werd waargenomen. De inhibitie was reversibel, want het stoppen van calciumperoxide toevoeging gaf aanleiding tot volledig herstel van de biogasproductie.

4.3 Gereticuleerd polyurethaanschuim

Dragermateriaal zoals gereticuleerd polyurethaanschuim kan een oplossing bieden als de biomassaretentie gebrekkig is in anaerobe reactoren (Speece, 2008). Tevens kan het de benodigde structuur leveren zodat er een hechte microbiële gemeenschap ontstaat in de reactor (Kim et al., 2002). Biomassaretentie was geen probleem in de uitgevoerde experimenten aangezien ze in batch gevoed werden met een zeer geconcentreerde voedingsoplossing. Het effect van gereticuleerd polyurethaanschuim op de samenwerking van de micro-organismen was daardoor klein, zodat geen optimalisatie van de biogasproductie waarneembaar was. Een andere verklaring voor het uitblijven van een significante invloed kan gevonden worden in het gebruikte substraat. Door te voeden met propionzuur werd de extracellulaire polymeerproductie niet zo sterk gestimuleerd als het geval zou zijn bij een complex substraat. Net die extracellulaire polymeren worden als cruciaal bestempeld om de vasthechting van de micro-organismen aan het polyurethaan te stimuleren (Ribeiro et al., 2005).

4.4 Palladium

Palladium staat algemeen bekend als industriële katalysator van reductieve reacties dankzij zijn capaciteit om waterstofgas op te slaan als waterstofradicalen. Op deze manier kan Pd(0) tot 900 keer het eigen gewicht aan waterstofgas absorberen (Livingstone, 1973; Mabbett et al., 2004). Ondanks het feit dat een optimale partiële waterstofgasdruk essentieel is voor het anaerobe proces, werd er tot dag 62 geen bevorderend of inhiberend effect van palladium op de biogasproductie of de CZV afbraak geobserveerd. Bij de laatste voeding met 30 g HPr-CZV daarentegen produceerde de reactor met palladium sneller biogas dan de controlereactor. Dit effect was het sterkste voor de reactor met $10 \mu\text{g Pd L}^{-1}$. Bij hogere concentraties werd het positieve effect waarschijnlijk deels tegengewerkt door de toxiciteit van het Pd-ion (Liu et al., 1979).

Het positieve effect van palladium werd nog sterker waargenomen in een test uitgevoerd met palladium in rumenvocht (Fievez en Vlaeminck, 2009). De methaanproductie werd gestimuleerd naarmate de concentratie toegevoegd palladium groter was, waarbij een concentratiebereik van $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ tot 10 mg L^{-1} getest werd.

Er zijn drie factoren die het effect van palladium kunnen limiteren binnen dit eindwerk. (1) Ten eerste werden de reactoren in dit eindwerk gevoed met propionzuur, terwijl de rumentest cellulose in de vorm van gras te verwerken kregen. In het geval van cellulose komen alle reacties van de anaerobe vergisting aan bod, inclusief hydrolyse en acidogenese. Dit is in tegenstelling tot de omzetting van propionzuur die enkel acetogenese en methanogenese omvat. Als het effect van palladium de reducerende omgeving bevordert voor reacties van de hydrolyse of acidogenese, zal de invloed bij een propionzuurvoeding beperkt blijven. (2) Een tweede factor is het feit dat de palladiumkatalysator in de anaerobe reactoren deels vergiftigd kan worden door sulfide dat onvermijdelijk aanwezig is in de anaerobe reactoren (Korte et al., 2000; Munakata en Reinhard, 2007). (3) Tot slot is het mogelijk dat er slibdeeltjes en particulier materiaal geadsorbeerd worden aan de kleine hoeveelheid palladium die aan de reactoren werd toegevoegd, waardoor de katalytische werking gelimiteerd wordt.

Verder onderzoek is noodzakelijk om te bepalen of er in situ bio-palladium vorming heeft plaatsgevonden. Micro-organismen uit anaerobe UASB-reactoren zijn in staat om Se(0) nanopartikels te produceren (van Hullenbusch et al., 2006) en bepaalde *Archaea*-species kunnen Au(III) omzetten naar Au(0) (Hennebel et al., 2009a). Daardoor vormen anaerobe vergisters een interessant milieu om te screenen voor palladiumreducerende micro-organismen. Bovendien zou dit een doorbraak zijn omdat deze bacteriën zorgen voor de vorming van nanopartikels en tegelijkertijd opgeladen worden door het reactieve waterstofgas gevormd in de vergistingsreactor. XAFS (X-ray absorption fine structure) spectroscopie zou een geschikte techniek zijn om dit te onderzoeken, aangezien deze techniek zelfs in complexe stalen gedetailleerde informatie over de oxidatietoestand van een bepaald element kan geven (Gunter et al., 2002).

4.5 Bio-palladium

Nanopartikels hebben een hoog specifiek oppervlak en hoge reactiviteit, waardoor ze zeer geschikt zijn voor katalytische toepassingen (De Windt et al., 2005; Hennebel et al., 2009a). Bacterieel dragermateriaal stabiliseert de nulwaardige nanopartikels en bevordert bovendien het contact tussen de nanopartikels en de pollutanten (De Windt et al., 2005; Hennebel et al., 2009a). Verder is het bio-Pd als niet-ionische vorm onoplosbaar en daardoor minder toxisch voor de anaerobe bacteriën dan Pd(II) (Liu et al., 1979).

De batchreactoren konden de voeding tot 12 g HPr-CZV zeer goed verwerken, waardoor er nauwelijks een invloed van de bio-Pd dosissen in de reactoren opgemerkt kon worden. De laatste voeding met 30 g HPr-CZV daarentegen was een hoge belasting voor de reactoren, wat duidelijk bleek uit het feit dat het enkele dagen duurde voor de biogasproductie op gang kwam. De reactor met de hoogste concentratie, 1 mg bio-Pd L⁻¹, vertoonde hierbij de snelste biogasproductie, wat een indicatie geeft dat bio-palladium kan helpen bij reactoren onder stress door hoge belasting. Bij het toevoegen van bio-Pd aan rumenvocht werd eveneens een hogere methaanproductie bekomen (Fievez en Vlaeminck, 2009). Dit dient verder onderzocht te worden om meer inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme. Zo zou het zeer interessant zijn om de partiële waterstofgasdruk en de verhouding tussen CO₂, H₂ en CH₄ in het biogas te kunnen meten om online te volgen of toevoegen van bio-palladium hierop een invloed heeft.

4.6 Besluit: Optimalisatie van anaerobe vergisting

In de zoektocht naar een optimaliserende strategie voor goed functionerende anaerobe reactoren bleef de biogasproductie bij toevoegen van micro-nutriënten onveranderd. Calciumperoxide had een te sterke oxidatieve capaciteit om de positieve gevolgen van micro-aeratie te bewerkstelligen. Gereticuleerd polyurethaanschuim kan de biomassaretentie verbeteren, maar had in de geteste batchreactoren geen invloed.

Palladium in een concentratie van $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en 1mg L^{-1} bio-palladium hadden bij een hoge belasting een positief effect op de biogasproductie. De conclusie dat het waterstof-reactieve palladium als ion of als Pd(0) sturend kan zijn in de complexe metabole omzettingen van organisch materiaal in het biomethanatie proces is zonder meer nieuw. Dit kan interessante mogelijkheden inhouden voor het optimaliseren van de waterstof-transferprocessen in de anaerobe reactoren.

Deel VI: Besluiten en verder onderzoek

Hoofdstuk 1 Algemene besluiten

Anaerobe vergisting is een delicaat proces dat gevoelig is voor procesverstoringen aangezien er een opeenvolging van reacties in een kwetsbaar microbiëel consortium aan de basis ligt. Om het evenwicht binnen de reactor te behouden, levert een gecontroleerd influent een belangrijke bijdrage. Industriële toepassingen verlangen echter meer flexibiliteit in de toepassing van het vergistingsproces, waardoor de kans op verstoringen aanzienlijk verhoogt.

In dit eindwerk was de vergisting van keukenafval in een continu proces gebrekkig van zodra de organische volumetrische belasting meer dan $2 \text{ g CZV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ werd. Deze conclusie was geldig zowel voor mesofiele als thermofiele incubatie. Optimalisatie van de CTR-bedrijfsvoering tot CSTR-reactoren door het mengen van de reactorinhoud en decanteren van het effluent leverde gelijkaardige resultaten op wat betreft de maximale OVB.

Ondanks het feit dat de overgang van CTR naar CSTR geen verbetering in biogasproductie opleverde, was er wel degelijk een verschil in de microbiële gemeenschap te zien in de vorm van een extra *Bacteria* species dat verscheen in het DGGE-patroon. Tevens werd er voor de bacteriële gemeenschap een veelbelovend verband aangetoond tussen microbiële parameters, zoals Gini en rijkheid, en de Ripley-index, een indicator voor de verhouding tussen VVZ en alkaliniteit in de reactor. Hieruit kan besloten worden dat de Ripley-index een duidelijk beeld geeft van de toestand van de microbiële gemeenschap in de reactor. Voor *Archaea* werd vooralsnog een dergelijk verband niet teruggevonden, vermoedelijk omdat deze met enige vertraging reageren op de werking van de *Bacteria* in de reactor. Zowel voor *Bacteria* als voor *Archaea* waren de Gini-coëfficiënt en de rijkheid sterk gecorreleerd. De mesofiele reactoren hadden een veel rijkere gemeenschap dan de thermofiele reactoren, waar er meer sprake was van specialisatie.

Eens reactoren gefaald zijn, is het een moeilijke opgave om het herstel te bevorderen. Toevoegen van ijzersulfaat of micronutriënten in de vorm van ML was geen goede strategie om de biogasproductie te stimuleren in het geval van reactoren die gefaald waren door een te hoge OVB aan keukenafval. Op wekelijkse basis een grote dosis micro-nutriënten had daarentegen wel een bevorderend effect in de zin van een lagere finale CZV concentratie in de reactor. Aan de hand van een theoretische berekening werd de mogelijkheid van PDMS-membranen voor het verlagen van ammoniumtoxiciteit als lastig gekwalificeerd.

Er werd in dit eindwerk tot slot getracht om strategieën te ontwikkelen ter bevordering van het anaerobe proces. Belangrijk hierbij is om in gedachten te houden dat deze resultaten zeer afhankelijk zijn van de reactorcondities en het gebruikte substraat. Toevoeging van micro-nutriënten kon niet verhinderen dat de biogasproductie faalde bij een bepaalde maximale OVB. De oxiderende capaciteit van calciumperoxide was te sterk om micro-aeratie te bekomen. Gereticuleerd polyurethaanschuim bracht geen verbetering aangezien de biomassaretentie in de bestudeerde batchreactor geen probleem vormde. Door de partiële waterstofgasdruk te beïnvloeden, had toevoeging van $10 \mu\text{g L}^{-1}$ palladium en 1mg L^{-1} bio-palladium daarentegen een positief effect op de biogasproductie wanneer de reactoren aan een hoge belasting onderworpen werden. Dit resultaat opent nieuwe onderzoekspaden voor het optimaliseren van de waterstof-transferprocessen in de anaerobe reactoren.

Hoofdstuk 2 Voorstellen voor verder onderzoek

Verder onderzoek is noodzakelijk om de anaerobe vergisting van keukenafval te optimaliseren. Een eerste aanzet hiertoe is de voorbehandeling van het keukenafval om de hydrolyse te verbeteren (Kuo en Cheng, 2007). Verder zou via microbiële analyses bepaald kunnen worden of er essentiële micro-organismen worden uitgespoeld die misschien door implementatie van dragermateriaal of een langere hydraulische verblijftijd beter weerhouden kunnen worden in de reactoren. In dit eindwerk is de nabehandeling van het effluent van de reactoren niet aan bod gekomen aangezien dit op zich al een zeer uitgebreid onderzoeksonderwerp is, maar op dat vlak is het interessant om te zien welke stappen noodzakelijk zijn om een loosbaar effluent te bekomen (Switzenbaum, 1995).

De microbiële analyses uitvoeren met behulp van RNA in plaats van DNA zou inzicht geven in welke micro-organismen werkelijk actief zijn in de reactor. DNA geeft immers vooral een indicatie van welke species aanwezig zijn, maar RNA is gerelateerd met het actieve gedeelte van de gemeenschap. Nucleïnezuren van *Archaea* zijn moeilijker om te amplificeren dan bacteriële nucleïnezuren, dus optimalisatie van primers en PCR-protocol is hiervoor nog aangewezen. Verder zou een Q-PCR meer informatie kunnen onthullen wat betreft het aandeel van de *Archaea* en de populatiedynamica. Het sequencen van het species dat in dit eindwerk verscheen in het DGGE-patroon bij hogere belasting en bij de CSTR-bedrijfsvoering zou meer informatie aanbrengen omtrent welk soort micro-organisme kan helpen bij het verwerken van hogere belastingen. Tot slot zou het interessant zijn om te kunnen bepalen of de analyse van de microbiële gemeenschap een voorspelling kan geven of de reactor in positieve of negatieve richting zal evolueren.

Het herstel van gefaalde reactoren blijft nog steeds een delicate kwestie. Eens de microbiële gemeenschap in de anaerobe reactor niet meer naar behoren functioneert, is het een zeer moeilijk opgave om de reactor in situ te herstellen. Voorlopig wordt meestal de reactorinhoud verdund om zo de concentratie aan toxische stoffen te verlagen, maar het herstellen van gefaalde reactoren blijft een belangrijke problematiek om verder te onderzoeken.

De zoektocht naar een strategie om het anaerobe vergistingsproces te verbeteren is een belangrijk item. Zo is de benodigde dosis van micro-nutriënten vaak nog een beredeneerde gok, dus meer onderzoek is noodzakelijk omtrent de biobeschikbaarheid van micro-nutriënten en de grens tussen essentiële en toxische dosissen. In verband met het effect van palladium en bio-palladium zou het interessant zijn om na te gaan of het een invloed kan hebben op de vergisting van complexere substraten zoals cellulose. Bij de praktische toepassing van (bio-)palladium in vergistingsreactoren moet geleidelijke vrijgave van (bio-)palladium in het milieu vermeden worden. Contaminatie met (bio-) palladium is niet gewenst, enerzijds door de mogelijke toxiciteit (Liu et al., 1979) en anderzijds door de hoge kostprijs van de grondstof, momenteel 5500 euro per kilogram (PalladiumPriceTM, 2009). Een oplossing hiervoor zou het gebruik van een membraan zijn waardoor het palladium vastgehouden wordt en toch vlot kan reageren met de

organische componenten in de vloeistoffen. Dit principe werd reeds onderzocht en uitgetest door Hennebel et al. (2009b). Tot slot is verder onderzoek noodzakelijk om te bepalen of er bio-palladium vorming kan gebeuren in de anaerobe reactoren. Moest dit het geval zijn, opent dit nieuwe wegen voor de productie van bio-palladium op basis van nieuwe micro-organismen. Anaerobe vergisters zijn hiervoor een interessant milieu, omdat ze een uitgebreid microbiëel consortium huisvesten. Bovendien zijn bepaalde *Archaea*-species in staat om Au(III) om te zetten naar Au(0) (Hennebel et al., 2009a), dus is de kans reëel dat er eveneens Archaea bestaan die Pd(II) kunnen omzetten naar Pd(0). Dit kan onderzocht worden met behulp van XAFS spectroscopie (Gunter et al., 2002), een techniek die zelfs in complexe media zoals een staal van een anaerobe vergister gedetailleerde informatie kan verschaffen over de oxidatietoestand van het bestudeerde element.

Referenties

- Adhikari, B. K., Barrington, S. en Martinez, J. (2006). "Predicted growth of world urban food waste and methane production." *Waste Management & Research* 24: 421-433.
- Aelterman, P. (2004). "Nano-precipitatie van metalen door *Shewanella oneidensis* in relatie tot biocorrosie en biokatalyse". Thesis, Faculteit landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen, Universiteit Gent.
- Ahring, B. K., Sandberg, M. en Angelidaki, I. (1995). "Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters." *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(3): 559-565.
- Aiyuk, S., Amoako, J., Raskin, L., van Haandel, A. en Verstraete, W. (2004). "Removal of carbon and nutrients from domestic wastewater using a low investment, integrated treatment concept." *Water Research* 38(13): 3031-3042.
- Aiyuk, S., Forrez, I., Lieven, D. K., van Haandel, A. en Verstraete, W. (2006). "Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates - A review." *Bioresource Technology* 97(17): 2225-2241.
- Angelidaki, I. en Ahring, B. K. (1993). "Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia." *Applied Microbiology and Biotechnology* 38(4): 560-564.
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A. en Domínguez-Espinosa, R. (2004). "Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater." *Trends in Biotechnology* 22(9): 477-485.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreve, J. en Dewil, R. (2008). "Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge." *Progress in Energy and Combustion Science* 34(6): 755-781.
- Azbar, N., Ursillo, P. en Speece, R. E. (2001). "Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes." *Water Research* 35(3): 817-829.
- Babel, S., Fukushi, K. en Sitanrassamee, B. (2004). "Effect of acid speciation on solid waste liquefaction in an anaerobic acid digester." *Water Research* 38(9): 2417-2423.
- Banks, C. (2003). "Biodigestion of kitchen waste. A comparative evaluation of mesophilic and thermophilic biodigestion for the stabilisation and sanitisation of kitchen waste", The University of Southampton en Greenfich Ltd.
- Barredo, M. S. en Evison, L. M. (1991). "Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospirillum hungatii* at different pH values." *Applied and Environmental Microbiology* 57(6): 1764-1769.
- Bashir, B. H. en Matin, A. (2004). "Sodium toxicity control by the use of magnesium in an anaerobic reactor." *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 8(1): 17-21.

- Batstone, D. J., Picioreanu, C. en van Loosdrecht, M. C. M. (2006). "Multidimensional modelling to investigate interspecies hydrogen transfer in anaerobic biofilms." *Water Research* 40(16): 3099-3108.
- Boe, K., Steyer, J. P. en Angelidaki, I. (2008). "Monitoring and control of the biogas process based on propionate concentration using online VFA measurement." *Water Science and Technology* 57(5): 661-666.
- Boon, N., Top, E. M., Verstraete, W. en Siciliano, S. D. (2003). "Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load." *Applied and Environmental Microbiology* 69(3): 1511-1520.
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Ben Cheikh, R. en Hamdi, M. (2005). "Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes." *Process Biochemistry* 40(3-4): 989-995.
- Bruschke, H. (1994). "Industrial application of membrane separation processes". 13th IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics, Clermont Ferrand, France, Blackwell Science Ltd.
- Buhr, H. O. en Andrews, J. F. (1977). "Thermophilic anaerobic digestion process." *Water Research* 11(2): 129-143.
- Bull, M. A., Sterritt, R. M. en Lester, J. N. (1984). "An evaluation of single-phase and separated-phase anaerobic industrial wastewater-treatment in fluidized-bed reactors." *Biotechnology and Bioengineering* 26(9): 1054-1065.
- Buyle, J. (2008). "Propionzuurremediatie in anaerobe vergisting". Thesis, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent.
- Chen, W. H., Han, S. K. en Sung, S. (2003). "Sodium inhibition of thermophilic methanogens." *Journal of Environmental Engineering-Asce* 129(6): 506-512.
- Chen, Y., Cheng, J. J. en Creamer, K. S. (2008). "Inhibition of anaerobic digestion process: A review." *Bioresource Technology* 99: 4044-4064.
- Claros, M. G. en Canovas, F. M. (1998). "Rapid high quality RNA preparation from pine seedlings." *Plant Molecular Biology Reporter* 16(1): 9-18.
- Clement, B. en Merlin, G. (1995). "The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweed." *Science of the Total Environment* 170(1-2): 71-79.
- Climenhaga, M. A. en Banks, C. J. (2008). "Anaerobic digestion of catering wastes: effect of micronutrients and retention time." *Water Science and Technology* 57(5): 687-692.
- Colleran, E., Finnegan, S. en Lens, P. (1995). "Anaerobic treatment of sulfate-containing waste streams." *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 67(1): 29-46.
- Cresson, R., Carrere, H., Delgenes, J. P. en Bernet, N. (2006). "Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor - Impact of nutrient complementation." *Biochemical Engineering Journal* 30(1): 55-62.
- Dague, R. R., Habben, C. E. en Pidaparti, S. R. (1992). "Initial studies on the anaerobic sequencing batch reactor". 16th Biennial Conf of the International Assoc on Water Pollution Research and Control, Washington, Dc, Pergamon-Elsevier Science Ltd.

- de Baere, L. A., Devocht, M., Van Assche, P. en Verstraete, W. (1984). "Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations." *Water Research* 18(5): 543-548.
- De Windt, W., Aelterman, P. en Verstraete, W. (2005). "Bioreductive deposition of palladium(0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls." *Environmental Microbiology* 7(3): 314-325.
- Dearman, B., Marschner, P. en Bentham, R. H. (2006). "Methane production and microbial community structure in single-stage batch and sequential batch systems anaerobically co-digesting food waste and biosolids." *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(5): 589-596.
- Demirel, B. en Yenigun, O. (2002). "Two-phase anaerobic digestion processes: a review." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77(7): 743-755.
- Deublein, D. en Steinhauser, A. (2008). "Biogas from waste and renewable resources". Weinheim, Wiley-VCH.
- Dimroth, P. en Thomer, A. (1989). "A primary respiratory Na⁺ pump of an anaerobic bacterium: the Na⁺ dependent NADH:quinone oxidoreductase of *Klebsiella Pneumoniae*." *Archives of Microbiology* 151(5): 439-444.
- Doshi, R., Day, P. J. R. en Tirelli, N. (2009). "Dissolved oxygen alteration of the spectrophotometric analysis and quantification of nucleic acid solutions." *Biochemical Society Transactions* 37: 466-470.
- Downing, K. M. en Merkens, J. C. (1955). "The influence of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of un-ionised ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson)." *Annals of Applied Biology* 43: 243-246.
- Downing, L. S., Bibby, K. J., Esposito, K., Fascianella, T., Tsuchihashi, R. en Nerenberg, R. (2009). "Nitrogen removal from wastewater using a hybrid membrane-biofilm process (HMBP): pilot scale studies." *Water Environment Research* Submitted for publication.
- Dupla, M., Conte, T., Bouvier, J. C., Bernet, N. en Steyer, J. P. (2002). "Dynamic evaluation of a fixed bed anaerobic digestion process in response to organic overloads and toxicant shockloads". 5th IWA Conference on Trends in Sustainable Production, Nimes, France, IWA Publishing.
- Dybas, M. en Konisky, J. (1992). "Energy transduction in the methanogen *Methanococcus voltae* is based on a sodium current." *Journal of Bacteriology* 174(17): 5575-5583.
- Emerson, K., Russo, R. C., Lund, R. E. en Thurston, R. V. (1975). "Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32(12): 2379-2383.
- Erickson, R. J. (1985). "An evaluation of mathematical models for the effects of pH and temperature on ammonia toxicity to aquatic organisms." *Water Research* 19(8): 1047-1058.
- Fang, H. H. P., Chui, H. K. en Li, Y. Y. (1994). "Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters". IAWQ 7th International Symposium on Anaerobic Digestion, Cape Town, South Africa, Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Feijoo, G., Soto, M., Mendez, R. en Lema, J. M. (1995). "Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena." *Enzyme and Microbial Technology* 17(2): 180-188.

- Fievez, V. en Vlaeminck, B. (2009). "Ongepubliceerde resultaten".
- Furumai, H. (1997). "Modeling of hydrogen behavior and reduced product formation following perturbation with hydrogenic substrate in a methanogenic reactor." *Water Science and Technology* 36(6-7): 255-262.
- Garcia, M. L., Lapa, K. R., Foresti, E. en Zaiat, M. (2008). "Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage." *Journal of Environmental Management* 88(4): 1471-1477.
- Gerardi, M. H. (2003). "The microbiology of anaerobic digesters". New Jersey, John Wiley & Sons. Inc.
- Greenberg, A., Clesceri, L. en Eaton, A. (1992). "Standard methods for the examination of water and wastewater". Washington, American Public Health Association Publications.
- Gunter, K. K., Miller, L. M., Aschner, M., Eliseev, R., Depuis, D., Gavin, C. E. en Gunter, T. E. (2002). "XANES Spectroscopy: A Promising Tool for Toxicology:: A Tutorial." *NeuroToxicology* 23(2): 127-146.
- Han, Y., Sung, S. W. en Dague, R. R. (1997). "Temperature-phased anaerobic digestion of wastewater sludges". 8th IAWQ International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan, Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Hanaki, K., Nagase, M. en Matsuo, T. (1981). "Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process." *Biotechnology and Bioengineering* 23(7): 1591-1610.
- Hecht, C. en Griehl, C. (2009). "Investigation of the accumulation of aromatic compounds during biogas production from kitchen waste." *Bioresource Technology* 100(2): 654-658.
- Hecht, V., Bischoff, L. en Gerth, K. (1990). "Hollow fiber supported gas membrane for in situ removal of ammonium during an antibiotic fermentation." *Biotechnology and Bioengineering* 35(10): 1042-1050.
- Hennebel, T., De Gusseme, B., Boon, N. en Verstraete, W. (2009a). "Biogenic metals in advanced water treatment." *Trends in Biotechnology* 27(2): 90-98.
- Hennebel, T., Verhagen, P., Simoen, H., De Gusseme, B., Vlaeminck, S. E., Boon, N. en Verstraete, W. (2009b). "Remediation of trichloroethylene by bio-precipitated and encapsulated palladium nanoparticles in a fixed bed reactor." *Chemosphere* Accepted for publication.
- Hill, D. T., Cobb, S. A. en Bolte, J. P. (1987). "Using volatile fatty-acid relationships to predict anaerobic digester failure." *Transactions of the Asae* 30(2): 496-501.
- Holm-Nielsen, J. B., Al Seadi, T. en Oleskowicz-Popiel, P. (2009). "The future of anaerobic digestion and biogas utilization." *Bioresource Technology* In Press, Corrected Proof.
- Huang, J. S., Jih, C. G., Lin, S. D. en Ting, W. H. (2003). "Process kinetics of UASB reactors treating non-inhibitory substrate." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78(7): 762-772.
- Hulshoff Pol, L. W., Lens, P. N. L., Stams, A. J. M. en Lettinga, G. (1998). "Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters." *Biodegradation* 9(3): 213-224.

- Jenicek, P., Smejkalova, P., Pokorna, D., Zabranska, J. en Dohanyos, M. (2007). "The improvement of anaerobic digestion efficiency by microaerobic sulphide removal - full scale experience". 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. Brisbane.
- Jenkins, S. R., Morgan, J. M. en Sawyer, C. L. (1983). "Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration." *Journal Water Pollution Control Federation* 55: 148.
- Kabdasli, I., Tunay, O., Ozturk, I., Yilmaz, S. en Arikan, O. (1999). "Ammonia removal from young landfill leachate by magnesium ammonium phosphate precipitation and air stripping". 4th IAWQ International Specialised Conference on Small Wastewater Treatment Plants, Stratford Avon, England, Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Karakashev, D., Batstone, D. J., Trably, E. en Angelidaki, I. (2006). "Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*." *Applied and Environmental Microbiology* 72(7): 5138-5141.
- Kayhanian, M. (1994). "Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations " *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59(4): 349-352.
- Kayhanian, M. (1999). "Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions." *Environmental Technology* 20(4): 355-365.
- Kayhanian, M. en Rich, D. (1995). "Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrient requirements." *Biomass and Bioenergy* 8(6): 433-444.
- Khanal, S. K. en Huang, J. C. (2003). "Anaerobic treatment of high sulfate wastewater with oxygenation to control sulfide toxicity." *Journal of Environmental Engineering-Asce* 129(12): 1104-1111.
- Kim, M., Ahn, Y.-H. en Speece, R. E. (2002). "Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic." *Water Research* 36(17): 4369-4385.
- Korte, N. E., Zutman, J. L., Schlosser, R. M., Liang, L., Gu, B. en Fernando, Q. (2000). "Field application of palladized iron for the dechlorination of trichloroethene." *Waste Management* 20(8): 687-694.
- Krishnakumar, B., Majumdar, S., Manilal, V. B. en Haridas, A. (2005). "Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR)." *Water Research* 39(4): 639-647.
- Krsek, M. en Wellington, E. M. H. (1999). "Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil." *Journal of Microbiological Methods* 39(1): 1-16.
- Kuo, W. C. en Cheng, K. Y. (2007). "Use of respirometer in evaluation of process and toxicity of thermophilic anaerobic digestion for treating kitchen waste." *Bioresource Technology* 98(9): 1805-1811.
- Leitão, R. C., Silva-Filho, J. A., Sanders, W., van Haandel, A. C., Zeeman, G. en Lettinga, G. (2004). "The effect of operational conditions on the performance of UASB reactors for domestic wastewater treatment". 10th IWA International Congress on Anaerobic Digestion, Montreal, CANADA, IWA Publishing.
- Lettinga, G. (1995). "Anaerobic digestion and wastewater treatment systems." *Antonie Van Leeuwenhoek* 67(1): 3-28.

- Lettinga, G. (2001). "Digestion and degradation, air for life". Seminar on Anaerobic Digestion for Sustainable Development, Wageningen, Netherlands, IWA Publishing.
- Levén, L., Eriksson, A. R. B. en Schnürer, A. (2007). "Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste." *Fems Microbiology Ecology* 59(3): 683-693.
- Li, K., Guan, W., Wei, G., Liu, B., Xu, J., Zhao, L. en Zhang, Y. (2007). "Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)." *Journal of Applied Microbiology* 103(3): 675-682.
- Liu, G., Zhang, R., Sun, Z., Li, X. en Dong, R. (2007) Research progress in anaerobic digestion of high moisture organic solid waste. International Commission for Agricultural Engineering (CIGR),
- Liu, T. Z., Lee, S. D. en Bhatnagar, R. S. (1979). "Toxicity of palladium." *Toxicology Letters* 4(6): 469-473.
- Livingstone, S. E., Ed. (1973). Palladium: the element. *Comprehensive inorganic chemistry*. Oxford, Pergamon Press.
- Lloyd, J. R., Yong, P. en Macaskie, L. E. (1998). "Enzymatic recovery of elemental palladium by using sulfate-reducing bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4607-4609.
- Lo, K. V., Liao, P. H. en March, A. C. (1985). "Thermophilic anaerobic digestion of screened dairy manure." *Biomass* 6(4): 301-315.
- Ma, J., Mungoni, L. J., Verstraete, W. en Carballa, M. (2009). "Maximum removal rate of propionic acid as a sole carbon source in UASB reactors and the importance of the macro- and micro-nutrients stimulation." *Bioresource Technology* 100(14): 3477-3482.
- Mabbett, A. N., Yong, P., Farr, J. P. G. en Macaskie, L. E. (2004). "Reduction of Cr(VI) by "palladized" - biomass of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577." *Biotechnology and Bioengineering* 87(1): 104-109.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D. en Verstraete, W. (2008). "How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology." *Environmental Microbiology* 10(6): 1571-1581.
- McCarty, P. L. (1964). "Anaerobic waste treatment fundamentals III", *Public Works*. 95: 91-94.
- McHugh, S., Collins, G., Mahony, T. en O'Flaherty, V. (2004). "Biofilm reactor technology for low temperature anaerobic waste treatment: microbiology and process characteristics". IWA International Conference on Biofilm Structure and Activity, Las Vegas, NV, IWA Publishing.
- Miura, Y., Hiraiwa, M. N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y. en Okabe, S. (2007). "Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance." *Water Research* 41(3): 627-637.
- Mosche, M. en Jordening, H. J. (1998). "Detection of very low saturation constants in anaerobic digestion: Influences of calcium carbonate precipitation and pH." *Applied Microbiology and Biotechnology* 49(6): 793-799.

- Munakata, N. en Reinhard, M. (2007). "Palladium-catalyzed aqueous hydrodehalogenation in column reactors: Modeling of deactivation kinetics with sulfide and comparison of regenerants." *Applied Catalysis B-Environmental* 75(1-2): 1-10.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. en Uitterlinden, A. (1993). "Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer, G. en Smalla, K. (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Nielsen, H. B. en Angelidaki, I. (2008). "Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition." *Bioresource Technology* 99(17): 7995-8001.
- Nielsen, H. B., Mladenovska, Z. en Ahring, B. K. (2008). "Kinetics of propionate conversion in anaerobic continuously stirred tank reactors." *Environmental Technology* 29(2): 151-160.
- Nielsen, H. B., Uellendahl, H. en Ahring, B. K. (2007). "Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter." *Biomass & Bioenergy* 31(11-12): 820-830.
- Nordberg, U. (2007). "Biogas - current situation and future potential". Report 993, Värmeforsk.
- Omil, F., Mendez, R. en Lema, J. M. (1995). "Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content." *Bioresource Technology* 54(3): 269-278.
- Osuna, M. B., Zandvoort, M. H., Iza, J. M., Lettinga, G. en Lens, P. N. L. (2003). "Effects of trace element addition on volatile fatty acid conversions in anaerobic granular sludge reactors." *Environmental Technology* 24(5): 573-587.
- PalladiumPriceTM (2009). "Palladium price." Geraadpleegd op 21 mei 2009, <http://palladiumprice.org/>
- Pavlostathis, S. G. en Giraldogomez, E. (1990). "Kinetics of anaerobic treatment". International Specialised Workshop on Anaerobic Treatment Technology for Municipal and Industrial Wastewaters, Valladolid, Spain, Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Pereboom, J. H. F. en Vereijken, T. L. F. M. (1994). "Methanogenic granule development in full-scale internal circulation reactors". 17th Biennial Conference of International Association on Water Quality - Water Quality International 94: Anaerobic Digestion; Sludge Management; Appropriate Technologies, Budapest, Hungary, Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Pfeffer, J. T. (1974). "Temperature effects on anaerobic fermentation of domestic refuse." *Biotechnology and Bioengineering* 16(6): 771-787.
- Pind, P. F., Angelidaki, I. en Ahring, B. K. (2003). "Dynamics of the anaerobic process: Effects of volatile fatty acids." *Biotechnology and Bioengineering* 82(7): 791-801.
- Rajeshwari, K. V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K. en Kishore, V. V. N. (2000). "State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 4(2): 135-156.
- Rao, P. P. en Seenayya, G. (1994). "Improvement of methanogenesis from cow dung and poultry litter waste digesters by addition of iron." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(2): 211-214.

- Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D., Camargo, E. F. M., Zaiat, M. en Borzani, W. (2000). "Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment." *Bioresource Technology* 75(2): 127-132.
- Ribeiro, R., Varesche, M. B. A., Foresti, E. en Zaiat, M. (2005). "Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices." *Journal of Environmental Management* 74(2): 187-194.
- Rincón, B., Borja, R., González, J. M., Portillo, M. C. en Sáiz-Jiménez, C. (2008). "Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue." *Biochemical Engineering Journal* 40(2): 253-261.
- Rinzema, A., Vanlier, J. en Lettinga, G. (1988). "Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor." *Enzyme and Microbial Technology* 10(1): 24-32.
- Ripley, L. E., Boyle, W. C. en Converse, J. C. (1986). "Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes." *Journal WPCF* 58(5): 406-411.
- Rooney-Varga, J. N., Giewat, M. W., Duddleston, K. N., Chanton, J. P. en Hines, M. E. (2007). "Links between archaeal community structure, vegetation type and methanogenic pathway in Alaskan peatlands." *Fems Microbiology Ecology* 60(2): 240-251.
- Sander, R. (1999, 17/12/2007). "Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry (version 3)." <http://www.henrys-law.org>
- Sarti, A., Garcia, M. L., Zaiat, M. en Foresti, E. (2007). "Domestic sewage treatment in a pilot-scale anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR)." *Resources, Conservation and Recycling* 51(1): 237-247.
- Schink, B. (1997). "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(2): 262-&.
- Schnürer, A., Zellner, G. en Svensson, B. H. (1999). "Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors." *Fems Microbiology Ecology* 29(3): 249-261.
- Siddique, T., Okeke, B. C., Zhang, Y., Arshad, M., Han, S. K. en Frankenberger, W. T. (2005). "Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw." *Journal of Environmental Quality* 34(1): 217-226.
- Silva, A. J., Hirasawa, J. S., Varesche, M. B., Foresti, E. en Zaiat, M. (2006). "Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing *Bacteria* and methanogenic *Archaea*." *Anaerobe* 12(2): 93-98.
- Song, Y.-C., Kwon, S.-J. en Woo, J.-H. (2004). "Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge." *Water Research* 38(7): 1653-1662.
- Soto, M., Mendez, R. en Lema, J. M. (1993). "Sodium inhibition and sulfate reduction in the anaerobic treatment of mussel processing wastewaters." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 58(1): 1-7.
- Sowers, K. R. en Gunsalus, R. P. (1988). "Adaptation for growth at various saline concentrations by the Archaeobacterium *Methanosarcina thermophila*." *Journal of Bacteriology* 170(2): 998-1002.

- Speece, R. E. (2008). "Anaerobic biotechnology and odor/corrosion control for municipalities and industries". Nashville, Archae Press.
- Steyer, J. P., Bernard, O., Batstone, D. J. en Angelidaki, I. (2006). "Lessons learnt from 15 years of ICA in anaerobic digesters." *Water Science & Technology* 53(4-5): 25-33.
- Sung, S. W. en Dague, R. R. (1995). "Laboratory studies on the anaerobic sequencing batch reactor." *Water Environment Research* 67(3): 294-301.
- Switzenbaum, M. S. (1995). "Obstacles in the implementation of anaerobic treatment technology." *Bioresource Technology* 53(3): 255-262.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F. en Massé, D. I. (2008). "Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors." *Water Research* 42(3): 513-537.
- Tang, Y. Q., Shigematsu, T., Ikbai, Morimura, S. en Kida, K. (2004). "The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester." *Water Research* 38(10): 2537-2550.
- van der Zee, F. P., Villaverde, S., Garcia, P. A. en Fdz-Polanco, F. (2007). "Sulfide removal by moderate oxygenation of anaerobic sludge environments." *Bioresource Technology* 98(3): 518-524.
- Van Haandel, A. C. en Lettinga, G. (1994). "Anaerobic sewage treatment: A practical guide for Regions with a hot climate". John Wiley and Sons.
- van Hullenbusch, E., Farges, F., Lenz, M., Lens, P. en Brown, G. E. (2006). "Selenium speciation in biofilms from granular sludge bed reactors used for wastewater treatment". 13th International Conference on X-Ray Absorption Fine Structure (XAFS13), Stanford, CA, Amer Inst Physics.
- vanStarkenburgh, W. (1996). "Anaerobic treatment of wastewater: State of the art". European-Environmental-Research-Organization (EERO) Workshop on Methanogenesis in Sustainable Environmental Protection, St Petersburg, Russia, Maik Nauka/Interperiodica.
- Vanvelsen, A. F. M. (1979). "Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations." *Water Research* 13(10): 995-999.
- Verstraete, W. (2008). "Microbiële technologie voor hergebruik, cursusnota's", Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent.
- Verstraete, W., Wittelbolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., de Vos, P., van de Wiele, T. en Boon, N. (2007). "Microbial resource management: The road to go for environmental biotechnology." *Engineering in Life Sciences* 7(2): 117-126.
- Vorotyntsev, V. M., Drozdov, P. N. en Vorotyntsev, I. V. (2009). "High purification of substances by a gas separation method." *Desalination* 240(1-3): 301-305.
- Watanabe, H., Kitamura, T., Ochi, S. en Ozaki, M. (1997). "Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions". 8th IAWQ International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan, Pergamon-Elsevier Science Ltd.

- Weiss, A., Jerome, V., Freitag, R. en Mayer, H. K. (2008). "Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant." *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(1): 163-173.
- Whittmann, C., Zeng, A. P. en Deckwer, W. D. (1995). "Growth inhibition by ammonia and use of pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 519-525.
- WHO (1989). "Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture". Technical report Series 778. Geneva, World Health Organization.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W. en Boon, N. (2009). "Initial community evenness favours functionality under selective stress." *Nature* 458(7238): 623-626.
- Yang, Y., Tada, C., Miah, M. S., Tsukahara, K., Yagishita, T. en Sawayama, S. (2004). "Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester." *Materials Science and Engineering: C* 24(3): 413-419.
- Zeeman, G. (2008). "Bio-methaan productie wereldwijd: toepassingen voor afval en afvalwater". Studienamiddag: Doordenken over vergisting van organisch materiaal, Ingenieurshuis Antwerpen, Technologisch instituut.
- Zeikus, J. G. (1979). "Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology." *Enzyme and Microbial Technology* 1(4): 243-252.
- Zitomer, D. H., Johnson, C. C. en Speece, R. E. (2008). "Metal stimulation and municipal digester thermophilic/mesophilic activity." *Journal of Environmental Engineering-Asce* 134(1): 42-47.
- Zoutberg, G. R. en de Been, P. (1997). "The Biobed® EGSB (expanded granular sludge bed) system covers shortcomings of the upflow anaerobic sludge blanket reactor in the chemical industry." *Water Science and Technology* 35(10): 183-188.