



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014 – 2015

Ontwikkelingsstrategieën voor thermofiele nitrificatie
ter behandeling van warm afvalwater

Delphine Prat

Promotoren: Prof. dr. ir. Nico Boon
Prof. dr. ir. Siegfried E. Vlaeminck

Tutor: ir. Emilie Courtens

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Milieutechnologie



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014 – 2015

Ontwikkelingsstrategieën voor thermofiele nitrificatie
ter behandeling van warm afvalwater

Delphine Prat

Promotoren: Prof. dr. ir. Nico Boon
Prof. dr. ir. Siegfried E. Vlaeminck

Tutor: ir. Emilie Courtens

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: Milieutechnologie

Woord vooraf

"LabMET researchers study microbial communities & interactions to better understand and steer ecological processes with an ultimate aim of improving and enabling biotechnological applications"

Dit is de missie van LabMET, de vakgroep waar ik de eer had een jaar onderzoek te mogen doen. Wetenschap is multidisciplinair en de opleiding bio-ingenieurswetenschappen leert ons kennis en inzicht in disciplines met betrekking tot plant, dier, mens en micro-organismen. Daarnaast worden we ook aangespoord bruggen te bouwen tussen verschillende vakgebieden. In LabMET ligt de focus op micro-organismen en de mogelijke toepassing ervan in het dagelijkse leven. De vakgroep is samengesteld uit 6 professoren met heel wat ervaring, een jonge dynamische groep doctoraatstudenten, technisch en organisatorisch personeel en dit gezelschap wordt jaarlijks aangevuld met enkele studenten. Al deze mensen zijn altijd bereid je te helpen of staan klaar voor een babbel, wat werken in deze vakgroep ook aangenaam maakt. Na de vele uren in het labo, was je als student ook altijd uitgenodigd op georganiseerde drinks, waardoor je je als student deel voelt van deze groep. De barbecue en aansluitende quiz waren ongetwijfeld mijn hoogtepunten van amusement op LabMET.



Uit deze grote groep wil ik eerst en vooral mijn promotoren prof. dr. ir. Nico Boon en prof. dr. ir. Siegfried Vlaeminck bedanken om mij de kans te bieden dit onderzoek uit te voeren. Ze deelden hun kennis en stuurden mijn onderzoek bij indien nodig. Ik heb veel van hen geleerd en heb enorm veel respect voor hen.

Mijn grootste dank gaat uit naar mijn tutor Emilie Courtens, die al haar ervaringen en kennis met mij wilde delen. Ze leerde mij alle protocols, op moleculaire technieken na, die nodig waren om mijn thesis tot een goed einde te brengen. Ze leerde mij ook resultaten kritisch te bekijken en alles op een wetenschappelijke manier te rapporteren. In haar drukke agenda had ze ook steeds tijd om me te helpen met talrijke batchtesten, mijn teksten na te lezen en van mogelijke commentaar te voorzien. Kortom, ze haalde het beste in mij naar boven.

Halverwege mijn onderzoek sloot Tom Vandekerckhove zich aan bij LabMET en hij was een grote hulp tijdens mijn onderzoek. Hij vond de tijd om me te helpen met batchtesten en om mijn reactoren, samen met Emilie, te onderhouden tijdens mijn examens. Dagelijks was hij vroeg op

kantoor, waardoor hij eveneens stalen nam van de reactoren om de performantie op te volgen en dit werd enorm geapprecieerd. Hij was ook steeds bereid mijn tekstvoorstellen na te lezen en van nodige commentaar en suggesties te voorzien. Bij hem kon ik altijd terecht met wetenschappelijke vragen, die hij dan op een kritische manier tracht te beantwoorden, wat mij ook nieuwe inzichten gaf. Hij zei nooit nee tegen een gezellige babbel, wat de sfeer enkel bevordert.

Daarnaast wil ik de mensen van Avecom bedanken voor het verschaffen van ABIL-slib voor mijn reactoren. Van het LabMET personeel wil ik tevens Greet Van de Velde bedanken, om samen met Emilie mijn talrijke IC stalen te analyseren. Ik wil eveneens mijn dank betuigen aan Tim Lacoere voor het aanleren van moleculaire technieken en het helpen met uitvoeren van protocols als tijd schaars werd. Aansluitend wil ik Ken bedanken voor het uitvoeren van qPCR op het DNA-stalen uit mijn reactoren.

Tevens wil ik alle leden van de N-student cluster bedanken. Het organiseren van deze cluster leerde mij de ideale manier om data weer te geven en het gaf mij uiteindelijk heel wat zelfvertrouwen om presentaties te geven. De aanwezige leden konden mij ook steeds kritische commentaren geven zodat ik nog andere inzichten kreeg. Hierbij wil ook José M. Carvajal Arroyo mijn dank betuigen, want door de thermofiele eigenschap van zijn onderzoek, werd veel interessante kennis uitgewisseld.

Graag wil ik mijn buurvrouw Carine Decuyper, die regentat Nederlands-Engels is, bedanken voor het nazicht van deze thesis op taalkundige fouten.

Ten slotte wil ik mijn ouders bedanken, om mij de kans te geven deze studies aan te vatten, mij te steunen doorheen deze periode en altijd te luisteren naar mijn talrijke verhalen, ook al begrepen ze niet veel van de wetenschappelijke kant. Mijn vrienden stonden ook altijd voor mij klaar, om na het harde werk toch een lach op mijn gezicht te toveren.

Samenvatting

Nitrificatie is een conventioneel proces om ammonium (NH_4^+) om te zetten in nitraat (NO_3^-), wat vervolgens via denitrificatie omgezet wordt in de niet-reactieve vorm stikstofgas (N_2). Nitrificatie is een standaardproces in waterzuiveringsinstallaties en door de grote antropogene bijdrage in productie van ammoniak en de milieuvervuulende capaciteit van reactief stikstof, is dit proces cruciaal. Wegens praktische limitatie wordt nitrificatie meestal uitgevoerd op mesofiele temperaturen (15-35 °C). Sommige stikstofbevattende afvalstromen hebben echter hogere temperaturen (> 40 °C), waardoor koelingsenergie nodig is voor de behandeling van dit water. Voorbeelden zijn thermofiele digestaten, industriële afvalstromen (brouwerijen, staalindustrie, mestindustrie...) en huishoudelijk afvalwater in gebieden met hoge seizoensgebonden temperaturen. Implementatie van thermofiele nitrificatie kan, naast de afwezigheid van het koelingsproces, mogelijks resulteren in hogere oxidatiesnelheden (kleinere reactoren mogelijk), lagere slibproductie (kleinere kost voor slibverwerking) en inactivatie van pathogenen.

Het doel van deze thesis is het bewerkstelligen van thermofiele nitrificatie via transitie van mesofiel slib naar hogere temperaturen, door een lineaire temperatuurstijging op te leggen. Deze transitie werd bestudeerd in twee verschillende reactorsystemen, één gebaseerd op gesuspendeerde groei (sequencing batch reactor, SBR) en de ander op biofilmgebaseerde groei (moving bed biofilm reactor, MBBR). De performantie werd vergeleken om het meest performante systeem te selecteren. Door de hogere robuustheid van een biofilm tegen extreme condities, werd initieel een betere performantie in de MBBR verwacht.

In een eerste fase werden de reactoren opgestart met commercieel nitrificerend inoculum (ABIL), om gedurende 79 dagen te stabiliseren bij 38 °C. Een biofilm werd gevormd op de polyvinylalcohol-carriers in de MBBR en in de SBR steeg het organisch gehalte van de zwevende stof. Simultaan werd een methode voor biomassa-bepaling op carriers geoptimaliseerd, om de vergelijking van specifieke activiteiten in de twee reactorsystemen mogelijk te maken. De eiwitconcentratie van biomassa op carriers werd bepaald met behulp van een ijkcurve, gebaseerd op Bovine Serum Albumine (BSA). Vervolgens werd de biomassaconcentratie met behulp van de vaste ratio eiwitconcentratie/VSS-concentratie, die 0.31 bedroeg, berekend.

In de tweede fase werd de temperatuur in de reactoren lineair verhoogd (0.16 °C d⁻¹ tot 40 °C en vervolgens 0.08 °C d⁻¹) en werd de performantie opgevolgd. In de MBBR daalde de activiteit van de ammoniumoxiderende micro-organismen (AOM) vanaf 45.5 °C, door de afwezigheid van de shift van ammoniumoxiderende bacteriën (AOB) naar archaea (AOA), aangetoond via qPCR. De behaalde nitrificatieactiviteit bedroeg toen 87 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹. In de SBR werd volledige nitrificatie uitgevoerd tot 49 °C, maar toen daalde de activiteit van de nitrietoxiderende bacteriën (NOB), waardoor geëvolueerd werd naar een systeem met partiële nitrificatie tot 49.5 °C. De oxidatiesnelheden waren 155 en 145 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ bij respectievelijk 49 en 49.5 °C.

Batchtesten werden uitgevoerd om de effectieve adaptatie en verdere adaptatiecapaciteit van de micro-organismen op te volgen en om de procesgevoeligheid voor vrij ammoniak te bepalen. Door de activiteit te bepalen op reactortemperatuur, 2 graden hoger en 2 graden lager, kon een

voorspelling voor mogelijke activiteit bij verdere temperatuuropdrijving gemaakt worden. Deze testen voorspelden een daling in activiteit van AOM na 44 °C in de MBBR en van NOB na 48 °C in de SBR, wat effectief gebeurde in de reactoren. Gevoeligheid voor vrij ammoniak werd ook bepaald. Aanvankelijk werden AOM gestimuleerd door vrij ammoniak, maar door de shift van AOB naar AOA in de SBR, werd finaal geen effect (stimulatie of remming) van vrij ammoniak opgemerkt tot concentraties van 6.37 mg N L⁻¹. Aanvankelijk werden NOB in beide reactoren geïnhibeerd door vrij ammoniak. Tijdens de operatie werd in de MBBR een opmerkelijke stijging van het abundantieratio *Nitrospira/Nitrobacter* waargenomen en gelijktijdig zwakte de inhibitie af. Finaal werden NOB in de MBBR niet geïnhibeerd tot 5.65 mg N L⁻¹. In de SBR was dit ratio finaal bij benadering gelijk aan de initiële waarde (41 bij 38 °C en 31 bij 48 °C), resulterend in een duidelijke inhibitie en IC₅₀ van 0.67 mg N L⁻¹.

De waarneembare slibproductie werd in beide reactoren bepaald. In de SBR daalde deze parameter initieel, om opnieuw te stijgen tot 0.07 g VSS g⁻¹ N na de shift van AOB naar AOA. De afsterving van biomassa vanaf 45.5 °C in de MBBR was duidelijk zichtbaar. De slibvolume-index na 5 minuten (SVI₅) werd bepaald in de SBR en bij 46 °C werd een daling van 241 naar 154 mL g⁻¹ VSS waargenomen, waardoor een betere bezinking geconcludeerd wordt. Dit liep ook samen met de shift van AOB naar AOA.

De SBR bleek het beste reactorsysteem om transitie van mesofiel nitrificerend slib naar hogere temperaturen te bewerkstelligen, in vergelijking met de MBBR, en een lineaire, relatief trage, temperatuuropdrijving is de beste strategie, in vergelijking met de literatuur. Bovendien kunnen batchtesten de adaptatiecapaciteit van de micro-organismen bepalen en dus een eventueel falen van reactoren voorspellen. Het mogelijke falen kan dan eventueel vermeden worden door de operatiestrategie aan te passen. Voor zover bekend in de literatuur, is de methode ontwikkeld in deze thesis de eerste succesvolle methode om een mesofiel nitrificatiesysteem om te vormen tot een thermofiele reactor. Door gebruik te maken van een asymptotisch temperatuurprofiel, kan de geschatte tijd voor implementatie (transitie van 35 naar 50 °C) beperkt worden tot 124 dagen.

Abstract

Nitrification is a conventional process to convert ammonium (NH_4^+) into nitrate (NO_3^-), which is then converted, through denitrification, into the non-reactive form nitrogen gas (N_2). Nitrification is a well-established process in water treatment installations and is crucial because of the large anthropogenic contribution in the production of ammonia and the pollution capacity of reactive nitrogen. Due to practical limitations, nitrification is usually performed at mesophilic temperatures (15-35 °C). However, some nitrogen containing waste streams are produced at higher temperatures (> 40 °C) which makes cooling necessary for the treatment of this water. Some examples of such streams are thermophilic digestates, industrial wastewater (breweries, steel industry, manure industry...) and municipal wastewaters with high seasonal temperatures. Implementation of thermophilic nitrification can result, apart from elimination of the cooling process, in eventually higher oxidation rates (smaller reactors possible), lower sludge production (lower cost for sludge treatment) and inactivation of pathogens.

The aim of this research is to achieve thermophilic nitrification through transition of mesophilic sludge to higher temperatures, by imposing a linear temperature increase. This transition was studied in two different reactor systems, one based on suspended growth (sequencing batch reactor, SBR) and another based on biofilm-based growth (moving bed biofilm reactor, MBBR). Their performances were compared to select the best performing system. Due to higher robustness of a biofilm at extreme conditions, a better performance was initially expected in the MBBR.

In the first research phase, the reactors were started with commercially available nitrifying inoculum (ABIL) in order to stabilize for 79 days at 38 °C. A biofilm was formed on the polyvinyl alcohol-carriers in the MBBR and the organic content of the suspended solids increased in the SBR. Simultaneously, a method was optimized for the determination of biomass on carriers, in order to allow the comparison of the specific activities in the two reactor systems. The protein concentration of the biomass on the carriers was determined, using a calibration curve, based on Bovine Serum Albumine (BSA). The biomass concentration was calculated using the fixed ratio protein concentration/VSS-concentration, which was 0.31.

In the second research phase, the temperature was linearly increased (0.16 °C d⁻¹ until 40 °C and then 0.08 °C d⁻¹) and the performance was monitored. The activity of the ammonium oxidizing micro-organisms (AOM) decreased in the MBBR from 45.5 °C, through the absence of the shift of the ammonia oxidizing bacteria (AOB) to archaea (AOA), demonstrated through qPCR. The obtained nitrification activity was 87 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ at that time. In the SBR, full nitrification was performed until 49 °C, but next the activity of the nitrite oxidizing bacteria (NOB) decreased, whereby the system evolved to a system with partial nitrification until 49.5 °C. The oxidation rates were 155 and 145 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ at respectively 49 and 49.5 °C.

Batch tests were performed to follow up on the effective adaptation and on subsequent the adaptation capacity of micro-organisms and to determine the process sensitivity to free ammonia. By determining the activity at reactor temperature, 2 degrees higher and 2 degrees lower, a prediction for possible activity at further temperature increase could be made. These tests predicted a decrease

in activity of AOM after 44 °C in the MBBR and of NOB after 48 °C in the SBR, which effectively took place in the reactors. Sensitivity to free ammonia was also determined. Initially AOM were stimulated by free ammonia, but because of the shift of AOB to AOA in the SBR, there was no effect (stimulation or inhibition) of free ammonia until 6.37 mg N L⁻¹. At first, NOB were inhibited by free ammonia in both reactors. During the operation, a remarkable increase of the abundance ratio *Nitrospira/Nitrobacter* was observed in the MBBR and simultaneously the inhibition weakened. Finally the NOB in the MBBR weren't inhibited up to 5.65 mg N L⁻¹. In the SBR, this final ratio was approximately equal to the initial value (41 at 38 °C and 31 at 48 °C), resulting in a clear inhibition and IC₅₀ of 0.67 mg N L⁻¹.

Observed sludge production was determined in both reactors. This parameter initially decreased in the SBR and increased again until 0.07 g VSS g⁻¹ N after the shift of AOB to AOA. The biomass die-off from 45.5 °C in the MBBR was clearly visible. The sludge volume index after 5 minutes (SVI₅) was determined in the SBR and a decrease from 241 to 154 mL g⁻¹ VSS was observed at 46 °C and a better settling can be concluded. This also coincided with the shift of AOB to AOA.

The SBR seems to be the best reactor system for transition of mesophilic nitrifying sludge to higher temperatures, in comparison with the MBBR, and a linear, but relative slow temperature increase is the best strategy, in comparison with literature. In addition, the batch tests can determine the adaptation capacity of micro-organisms and predict a possible failure of reactors. The predicted failure can possibly be avoided by adapting the operation strategy. As far as is known in the literature, the method developed in this thesis is the first successful method to create a thermophilic reactor through transition of a mesophilic nitrification system. By using an asymptotic temperature profile, the estimated time for implementation (transition from 35 to 50 °C) is limited to 124 days.

Inhoudstafel

Woord vooraf	i
Samenvatting	iii
Abstract	v
Inhoudstafel	vii
Lijst met gebruikte afkortingen	xi
Lijst met figuren	xiii
Lijst met tabellen	xv
Deel 1: Literatuurstudie	1
1 Problematiek	1
1.1 Stikstof	1
1.2 Warm afvalwater	2
2 Nitrificatie	3
2.1 Nitritatie	3
2.1.1 Ammoniumoxiderende bacteriën	4
2.1.2 Ammoniumoxiderende archaea	4
2.1.3 Nichedifferentiatie	4
2.1.4 Thermofiele ammoniumoxiderende organismen	4
2.2 Nitratatie	5
2.2.1 Nitrietoxiderende bacteriën	5
2.2.2 Thermofiele nitrietoxiderende organismen	5
3 Adaptatie mesofiele nitrificeerders	7
3.1 Tolerantie aan thermofiele temperaturen	7
3.2 Adaptatie na temperatuurschok	7
3.3 Adaptatie door middel van zoutstress	7
4 Reactoren	8
4.1 Sequencing batch reactor	8
4.2 Moving bed biofilm reactor	9
4.2.1 Technologie	9
4.2.2 Carrier	9
4.3 Effect van temperatuur op reactorcondities en -operatie	10
4.3.1 SBR	10

4.3.2	MBBR	11
4.4	Vergelijking SBR-MBBR.....	12
5	Doelstelling.....	13
Deel 2: Materialen en methoden		15
1	Reactoren: sequencing batch reactor versus moving bed biofilm reactor	15
1.1	Reactordesign	15
1.1.1	SBR.....	15
1.1.2	MBBR	16
1.2	Parameters	17
1.3	Inoculum.....	19
1.4	Performantie reactoren.....	19
1.5	Batchtesten.....	19
1.5.1	Optimale temperatuur	20
1.5.2	Gevoeligheid voor vrij ammoniak.....	20
2	Analytische methoden.....	20
2.1	Ammonium	20
2.1.1	Teststrips	20
2.1.2	Nessler	20
2.1.3	High-throughput.....	21
2.2	Nitriet.....	21
2.2.1	Teststrips	21
2.2.2	Ionenuitwisselingschromatografie (IC).....	21
2.2.3	High-throughput.....	21
2.3	Nitraat: Ionenuitwisselingschromatografie (IC)	22
2.4	Opgeloste zuurstof (DO).....	22
2.5	Zuurtegraad (pH)	22
2.6	Totale zwevende stoffen (TSS) en vluchtige zwevende stoffen (VSS).....	22
2.7	Statistische analyse.....	23
3	Optimalisatie van biomassabepaling op carriers.....	23
3.1	Extractiesolvent	23
3.2	Aantal segmenten per carrier.....	23
3.3	Schudden	24
3.4	Extractietemperatuur	24

3.5	Sonicatie	24
3.6	Extractieduur	24
3.7	Bepaling van eiwitconcentratie	24
3.8	Relatie eiwitconcentratie en VSS-concentratie in ABIL	25
3.9	Controletest met optimale protocol	25
4	Moleculaire technieken	25
4.1	DNA-extractie	25
4.2	Kwantitatieve polymerasekettingreactie (qPCR)	25
Deel 3: Resultaten		27
1	Optimalisatie van biomassabepaling op carriers	27
1.1	Extractiesolvent	27
1.2	Aantal segmenten per carrier	27
1.3	Schudden	28
1.4	Extractietemperatuur	28
1.5	Sonicatie	29
1.6	Extractieduur	29
1.7	Bepaling van eiwitconcentratie	30
1.8	Relatie eiwitconcentratie en VSS-concentratie in ABIL	30
1.9	Controletest	30
2	Stabilisatie reactoren	31
3	Temperatuuropdrijving reactoren	34
3.1	Reactorperformantie	34
3.2	Microbiële gemeenschapsanalyse	36
3.3	Temperatuuradaptatie	37
3.4	Gevoeligheid voor vrij ammoniak	39
3.5	Slibkarakteristieken	40
3.5.1	Slibvolume-index (SVI_5) en slibretentietijd (SRT)	40
3.5.2	Slibproductie (Y_{obs})	41
3.5.3	Morfologie	42
Deel 4: Discussie		45
1	Optimalisatie van biomassabepaling op carriers	45
2	Temperatuuropdrijving reactoren	46
2.1	Reactorperformantie	46

2.1.1	Vergelijking performantie van SBR en MBBR	46
2.1.2	Vergelijking reactorperformantie met literatuur	47
2.2	Microbiële gemeenschapsanalyse.....	50
2.3	Temperatuuradaptatie	51
2.4	Vrij ammoniak.....	52
2.5	Slibkarakteristieken	53
2.5.1	Slibvolume-index (SVI_5) en slibretentietijd (SRT).....	53
2.5.2	Slibproductie (Y_{obs}).....	54
3	Kosten-batenanalyse: mesofiele versus thermofiele nitrificatie.....	55
Deel 5: Conclusie.....		57
Deel 6: Toekomstig onderzoek.....		59
Deel 7: Duurzaamheid op LabMET		61
Deel 8: Referenties.....		63

Lijst met gebruikte afkortingen

ABIL	Ammonium bindend vloeibaar inoculum (<i>Ammonium binding inoculum liquid</i>)
AMO	Ammoniak mono-oxygenase
<i>amoA</i>	Ammoniak mono-oxygenase gen
Anammox	Anoxische ammonium oxidatie
AOA	Ammoniumoxiderende archaea
AOB	Ammoniumoxiderende bacteriën
AOM	Ammoniumoxiderende micro-organismen
ATP	Adenosinetrifosfaat
BSA	Bovine Serum Albumine
CAPEX	Investeringskosten (<i>Capital Expenditures</i>)
COD	Chemische zuurstofvraag (<i>Chemical oxygen demand</i>)
DO	Opgeloste zuurstof (<i>Dissolved oxygen</i>)
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridisatie
GDGTs	Glycerol dialkyl glycerol tetraethers
HAO	Hydroxylamine oxidoreductase
HRT	Hydraulische retentietijd
IC	Ionenuitwisselingschromatografie
IC ₅₀	50 % inhiberende concentratie
MBBR	Moving bed biofilm reactor
MSV	Minimale bezinkingssnelheid (<i>Minimal settling velocity</i>)
NOB	Nitrietoxiderende bacteriën
NOR	Nitriet oxidoreductase
OLAND	Zuurstof gelimiteerde autotrofe nitrificatie-denitrificatie (<i>Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification</i>)
OPEX	Operationele kosten (<i>Operating Expenditures</i>)

PVA	Polyvinylalcohol
qPCR	Kwantitatieve polymerasekettingreactie (<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>)
RBC	Roterende biologische contactor
SBR	Sequencing batch reactor
SDS	Natriumdodecylsulfaat
SRT	Slibretentietijd
SVI ₅	Slibvolume-index na 5 minuten bezinken in een Imhoff-kegel
TSS	Totale zwevende stoffen (<i>Total suspended solids</i>)
VSS	Vluchtige zwevende stoffen (<i>Volatile suspended solids</i>)
Y _{obs}	Waargenomen slibproductie (<i>Observed yield</i>)

Lijst met figuren

Figuur 1: De stikstofcyclus met de belangrijkste omzettingen (Bernhard, 2010).....	1
Figuur 2: PVA-gel carriers voor gebruik (Levstek et al., 2010)	10
Figuur 3: Microscopische structuur van het oppervlak van een PVA-gel carrier (Levstek et al., 2010)	10
Figuur 4: Schematische voorstelling van de SBR (links) en de MBBR (rechts)	16
Figuur 5: Schematische voorstelling van de verschillende fases van de cyclus van de SBR	16
Figuur 6: Schematische voorstelling van de cyclus van de MBBR.....	17
Figuur 7: Temperatuurverloop van de reactoren. Oorspronkelijk steeg de temperatuur met $0.16\text{ }^{\circ}\text{C d}^{-1}$, maar na het bereiken van $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, werd deze snelheid gehalveerd	18
Figuur 8: Biomassa per carrier (mg VSS) in functie van het aantal segmenten per carrier, berekend uit resultaten van eiwitmetingen.....	28
Figuur 9: Biomassa per carrier (mg VSS) in functie van de extractieduur, berekend uit resultaten van eiwitmetingen	29
Figuur 10: Uitzicht van de SBR (telkens links) en de MBBR (telkens rechts) aan de start van de stabilisatieperiode (A) en aan het einde van de stabilisatieperiode (B)	32
Figuur 11: Volumetrische nitrificatiesnelheden en biomassaconcentratie (gesuspendeerd en op carriers) in de SBR (links) en in de MBBR (rechts) tijdens de stabilisatieperiode bij $38\text{ }^{\circ}\text{C}$..	32
Figuur 12: Performantie van de SBR (links) en de MBBR (rechts) in functie van de operatietijd. A: Temperatuurprofiel. B: Volumetrische reactorperformantie. C: Specifieke nitrificatiesnelheid en biomassaconcentratie. D: Aantal gedetecteerde kopies van nitrificatiespecifieke genen.	35
Figuur 13: Temperatuur-activiteitscurven van de SBR en de MBBR voor zowel AOM als NOB. Batchtesten werden uitgevoerd op reactortemperatuur, aangegeven door het symbool, 2 graden kouder en 2 graden warmer. Een uitzondering hierop is de eerste curve bij reactortemperatuur $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ waar getest werd op $38, 40$ en $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ omdat er geen interesse is voor activiteit bij $36\text{ }^{\circ}\text{C}$. De resultaten zijn een relatieve weergave waarbij de hoogste activiteit per curve gelijkgesteld wordt aan 100 %. Significante optima worden aangeduid met een asterisk ($p < 0.05$)	38
Figuur 14: Relatieve activiteit in functie van vrij ammoniak (mg N L^{-1}) van AOM en NOB uit de SBR en de MBBR. Verschillende curven stellen de temperatuur voor waaraan slib geadapteerd werd in de reactoren. De activiteiten worden relatief voorgesteld ten opzichte van de activiteit opgemeten bij de laagste vrij-ammoniakconcentratie	40

Figuur 15: Slibvolume-index na 5 minuten van slib uit de SBR bij elke mijlpaaltemperatuur	41
Figuur 16: De waargenomen slibproductie ($\text{g VSS g}^{-1} \text{N}$) van de SBR en de MBBR bij elke mijlpaaltemperatuur	41
Figuur 17: Uitzicht van de reactoren (SBR links en MBBR rechts) op dag 18 van het experiment (reactortemperatuur = $39.7\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	42
Figuur 18: Uitzicht van de reactoren op dag 133 van het experiment (reactortemperatuur = $48.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in de SBR, links; reactortemperatuur = $46.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in de MBBR na een herstelperiode van 20 dagen, rechts).....	42
Figuur 19: Uitzicht van de SBR in de bezinkingsfase op dag 1 van het experiment (reactortemperatuur = $38\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	43
Figuur 20: Uitzicht van de SBR in de bezinkingsfase op dag 78 van het experiment (reactortemperatuur = $44\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	43
Figuur 21: Uitzicht van de SBR in de bezinkingsfase op dag 107 van het experiment (reactortemperatuur = $46\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	43
Figuur 22: Ongebruikte carriers (links) en geïnoculeerde carriers op dag 164 van het experiment (rechts).....	43
Figuur 23: De maximaal behaalde temperatuur met volledige nitrificatie ($^{\circ}\text{C}$) in functie van de stapgrootte van de temperatuurstijging ($^{\circ}\text{C d}^{-1}$) van dit experiment (rode symbolen) en voormalig studies (⁽²⁾ Courtens, Boon, et al., 2014; ⁽³⁾ Shore et al., 2012; ⁽¹⁾ Vandekerckhove, 2014)	48
Figuur 24: Ratio AOA/AOB (-) links en <i>Nitrospira/Nitrobacter</i> (rechts) in functie van de operatietijd (d)	50
Figuur 25: Optimale temperatuur (geteste temperatuur met hoogst opgemeten activiteit tijdens batchtesten) in functie van de toenmalige reactortemperatuur	51
Figuur 26: Inhibitie van <i>Nitrospira</i> en <i>Nitrobacter</i> in functie van de vrij-ammoniakconcentratie (mg N L^{-1}) bij $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Blackburne et al., 2007b).....	53
Figuur 27: De slibvolume-index na 30 minuten en de TSS-concentratie van het effluent van 4 SBR reactoren, werkend bij 4 verschillende temperaturen (Tripathi & Grant Allen, 1999).....	54

Lijst met tabellen

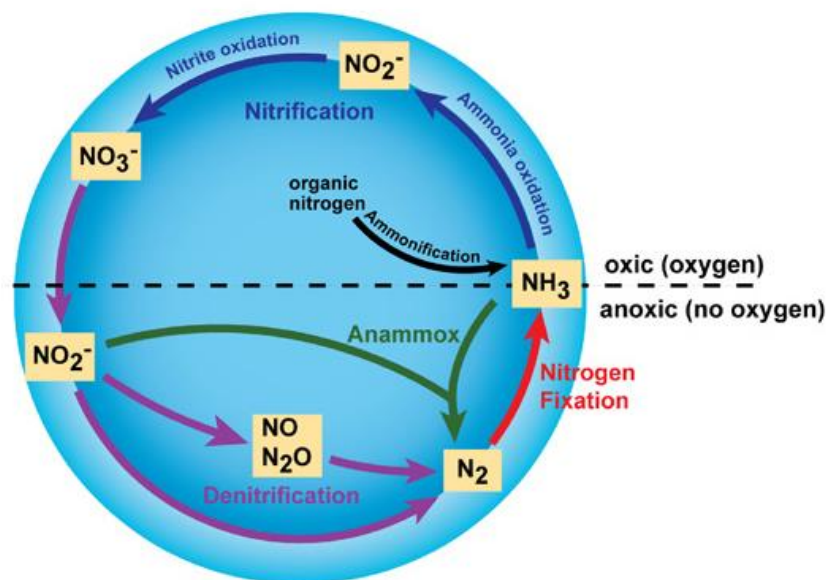
Tabel 1:	Samenvattende tabel met thermofiele nitrificerende organismen, geïsoleerd of gecultiveerd vanuit natuurlijke thermofiele omgevingen	6
Tabel 2:	Tabel met gedetecteerde nitrificerende bacteriën in thermofiele omgevingen	6
Tabel 3:	Samenvatting van eigenschappen van Kaldnes K1 carrier, BioPortz en PVA-gel carrier (Entex Technologies, 2010; Levstek & Plazl, 2009; Shore et al., 2012; Skerjanec et al., 2009)	10
Tabel 4:	Samenvattende tabel met voor- en nadelen bij de vergelijking van een SBR en een MBBR ..	12
Tabel 5:	Operationele parameters voor de SBR en de MBBR.....	18
Tabel 6:	Overzicht van de gebruikte primers en condities voor de bepaling van de abundantie van AOB, AOA en NOB met qPCR	26
Tabel 7:	Eiwitconcentratie van het extractiemiddel ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en biomassa op 1 carrier (mg VSS) bij een geschud en niet-geschud staal.....	28
Tabel 8:	Gemiddelde eiwitconcentratie in het extractiemiddel ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en biomassa op 1 carrier (mg VSS) bij gesoniceerde en niet-gesoniceerde stalen	29
Tabel 9:	Resultaten van bepaling van de VSS-concentratie (g L^{-1}) en de eiwitconcentratie (g L^{-1}) en de daaruit volgende ratio eiwitconcentratie/VSS-concentratie	30
Tabel 10:	Eiwitconcentraties ($\mu\text{g mL}^{-1}$), bekomen tijdens de controletest, en bijhorende p-waardes na het uitvoeren van een t-test	31
Tabel 11:	Overzicht van gebruikte symbolen in figuren	31
Tabel 12:	Maximale oxidatiesnelheden van gesuspendeerd slib uit beide reactoren en van biofilm, bepaald tijdens batchtesten.....	33
Tabel 13:	Abundantie van verschillende genera aan de start (1), tijdens (2) en aan het einde (3) van de stabilisatieperiode in de SBR en in de biofilm van de MBBR	33
Tabel 14:	Samenvatting van maximaal behaalde temperatuur ($^{\circ}\text{C}$) met bijhorende volumetrische ($\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$) en specifieke ($\text{mg N g}^{-1} \text{VSS d}^{-1}$) activiteit per reactor	47
Tabel 15:	Verschuiving in performantie en kosten bij thermofiele ten opzichte van mesofiele systemen, beschreven in literatuur (Lapara & Alleman, 1999; Tripathi & Grant Allen, 1999; Vogelaar et al., 2000)	55

DEEL 1: LITERATUURSTUDIE

1 Problematiek

1.1 Stikstof

Stikstof is een essentieel element voor het leven op aarde, aangezien het zowel voorkomt in proteïnen, aminozuren en DNA. Daarnaast bestaat de aardse atmosfeer ook voor 78%(v) uit stikstofgas zodat de voorraad verzekerd is (Vandecasteele & Block, 2006). Stikstof kan voorkomen in verschillende vormen en oxidatietoestanden en kan tijdens fysische, chemische en biologische processen omgezet worden (Figuur 1).



Figuur 1: De stikstofcyclus met de belangrijkste omzettingen (Bernhard, 2010).

Oorspronkelijk was deze cyclus in evenwicht en voornamelijk natuurlijke en fotochemische stikstoffixatie zetten stikstofgas, wat niet reactief is, om tot reactief, bio-beschikbaar ammoniak (NH₃) of ammonium (NH₄⁺). Verder leidt ongewenste verbranding tot de reactie van N₂ naar geoxideerde stikstof (NO_x). Tegenwoordig leveren industriële activiteiten een bijdrage aan de stikstoffixatie via het Haber-Bosch proces. Hierbij wordt N₂ gecombineerd met waterstofgas onder hoge druk (10 – 100 MPa) en temperatuur (400 – 550 °C), met behulp van een katalysator (1) (Chagas, 2007). De antropogene productie van reactief stikstof kende een aanzienlijke stijging in de laatste 50 jaar, terwijl de natuurlijke omzetting nagenoeg ongewijzigd bleef (Galloway et al., 2004).



Antropogene activiteiten zorgen, naast een verhoogde stikstoffixatie, eveneens voor een verhoogde lozing van stikstofrijk afvalwater in het milieu. Ten gevolge van overbesteding kan grondwater een

hoge concentratie aan reactief stikstof toegediend krijgen en bij gecombineerde overstorten bij piekbelastingen in waterzuiveringsinstallaties kan een grote dosis anorganisch stikstof in rivierwater terecht komen (Lee & Bang, 2000; Paul et al., 2014). Het samenspel van enerzijds meer stikstoffixatie en anderzijds de lozing van stikstofrijk afvalwater zorgt voor accumulatie van reactief stikstof in natuurlijke opslagplaatsen wat nefaste gevolgen kan hebben. In natuurlijke waterlopen kan een overmaat aan stikstof leiden tot eutrofiëring, terwijl veel ammoniak vissterfte tot gevolg kan hebben ($> 0.25 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$). Tot slot kan nitraat (NO_3^-) en/of nitriet (NO_2^-) leiden tot accumulatie van methemoglobine, een molecule die geen zuurstof kan binden, in het bloed.

Een manier om deze accumulatie te voorkomen, bekom je door het zuiveren van afvalwater. Dit wordt in Vlaanderen bewerkstelligd door stikstofnormen in te voeren waaraan gezuiverd afvalwater moet voldoen. Conventioneel wordt de verwijdering van stikstof uit afvalwater in deze regio gerealiseerd via nitrificatie en denitrificatie met behulp van actief slib.

1.2 Warm afvalwater

De optimale temperatuur voor nitrificatie met mesofiele micro-organismen in waterzuivering is tussen 35 en 38 °C en hun activiteit daalt aanzienlijk vanaf 40 °C (Lopez-Vazquez et al., 2014; Satoh et al., 2004). Er zijn echter stikstofrijke afvalstromen die deze temperatuur overschrijden, waardoor koeling noodzakelijk is, met stijgende operationele – en investeringskosten als gevolg. Warme industriële afvalwateren komen onder andere voor in de chemische, meststof-, staal- en alcoholindustrie (Shore et al., 2012; UNEP Caribbean Environment Programme, 1998). Verder zou thermofiele stikstofverwijdering een oplossing kunnen bieden voor de behandeling van thermofiele digestaten, en zodoende, de transitie van mesofiele naar thermofiele slibvergisting faciliteren, wat potentieel efficiënter en voordeliger is (Shi et al., 2013). In warme klimaten zoals India of Saoedi-Arabië kan huishoudelijk afvalwater temperaturen hoger dan 40°C bereiken zodat de kosten voor waterzuivering hier aanzienlijk stijgen.

Behandeling van afvalwater op hoge temperaturen heeft enkele voordelen ten opzichte van mesofiele behandeling, zoals een hogere reactiesnelheid waardoor hogere influent concentraties of kleinere bioreactoren mogelijk zijn, excellente processtabiliteit, betere verwijdering van pathogenen en een lagere slibproductie wat de kost voor slibverwerking kan drukken (Lapara & Alleman, 1999; Liao et al., 2011; Suvilampi & Rintala, 2002). Deze belangrijke voordelen impliceren dat thermofiele stikstofverwijdering niet beperkt hoeft te zijn tot warm afvalwater. Veel industrieën hebben namelijk restwarmte beschikbaar, wat gebruikt kan worden om mesofiel afvalwater op te warmen en zo van deze voordelen te genieten. Thermofiele werktemperaturen brengen echter ook uitdagingen met zich mee zoals verlaagde zuurstofoplosbaarheid, hogere turbiditeit van het effluent, hogere slib volume index (SVI) en lagere bezinkbaarheid ten gevolge van een hoger gehalte aan filamenten (Liao et al., 2011; S. Zhang et al., 2014). Hogere temperaturen resulteren mede in een hogere overdrachtscoëfficiënt van zuurstof, wat gedeeltelijk compenseert voor de lagere oplosbaarheid ervan (Vogelaar et al., 2000).

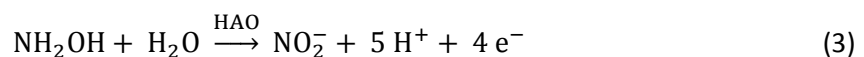
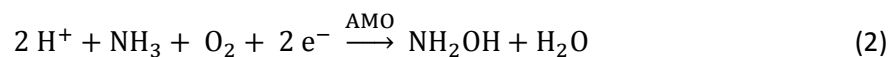
Thermofiele stikstofverwijdering kan bewerkstelligd worden door de biotechnologische implementatie van thermofiele nitrificerende organismen of door de transitie van gevestigde mesofiele nitrificerende gemeenschappen naar hogere temperaturen.

2 Nitrificatie

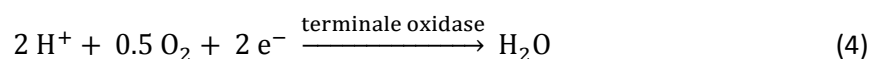
In de aardse atmosfeer komt veel stikstof voor in de vorm van stikstofgas (N_2), die zelden opgenomen kan worden door micro-organismen. Deze molecule kan echter wel via biologische processen, die deel uitmaken van de stikstofcyclus (Figuur 1), omgezet worden naar anorganische stikstofvormen: ammoniak (NH_3), ammonium (NH_4^+), nitriet (NO_2^-) en nitraat (NO_3^-). Micro-organismen kunnen vervolgens deze moleculen opnemen en stikstof incorporeren in hun weefsel. In dit onderzoek wordt de nadruk gelegd op nitrificatie, de conversie van ammonium (NH_4^+) naar nitraat (NO_3^-). Dit proces wordt echter opgesplitst in nitritatie en nitratatie, uitgevoerd door verschillende groepen organismen.

2.1 Nitritatie

Het tweestapsproces waarbij NH_3 omgezet wordt tot NO_2^- wordt nitritatie genoemd ((2) en (3)) (Kowalchuk & Stephen, 2001). In stap 1 wordt ammoniak omgezet tot hydroxylamine (NH_2OH) met behulp van het enzym ammoniak mono-oxygenase (AMO) (2). Vervolgens wordt dit tussenproduct verder omzet tot NO_2^- , gekatalyseerd door een periplasmatisch geassocieerd enzym genaamd hydroxylamine oxidoreductase (HAO).



Bij dit tweestapsproces worden 4 elektronen geproduceerd terwijl er slechts 2 opnieuw verbruikt worden. De overige worden via een elektronen transportketen tot bij de terminale oxidase (4) gebracht. Hierbij wordt een proton motive force gegenereerd, die op zich energie kan creëren via adenosinetrifosfaat (ATP) synthese (Kowalchuk & Stephen, 2001). Nitritatie is een verzurend proces door de vorming van protonen maar bij voldoende bufferende capaciteit van het milieu zal dit geen effect hebben.



Ammoniumoxiderende micro-organismen zijn chemolitho-autotrofen vermits deze ammoniak gebruiken als energiebron en CO_2 als koolstofbron (Hooper et al., 1997). Aangezien de hoeveelheid gewonnen energie uit dit proces laag is, hebben deze micro-organismen een lage opbrengst coëfficiënt en groeien ze traag (Bernhard, 2010; Lebedeva et al., 2005). Daarnaast zijn ze ook obligaat aeroob aangezien zuurstof noodzakelijk is voor deze reacties. Nochtans er zijn enkele species die zeer tolerant zijn voor lage zuurstofconcentraties of anoxische omgevingen (Bodelier et al., 1996). Vrij-ammoniakconcentraties vanaf 10 mg N L^{-1} zorgen voor inhibitie van deze organismen (Anthonisen et al., 2015).

Ammoniumoxidatie wordt zowel uitgevoerd door bacteriën (AOB) als archaea (AOA), maar in thermofiele condities blijken archaea stabielere gemeenschappen te vormen dan bacteriën (Itoh et al., 2013; Marks et al., 2012).

2.1.1 Ammoniumoxiderende bacteriën

Ammoniumoxiderende bacteriën (AOB) zijn fylogenetisch niet wijd verspreid onder de prokaryoten. Alle gekende aerobe AOB zijn Gram-negatieve Proteobacteria en behoren tot de genera *Nitrosomonas* (Proteobacteria, subklasse β), *Nitrospira* (Proteobacteria, subklasse β) en *Nitrosococcus* (Proteobacteria, subklasse γ) (Koops & Pommerening-ro, 2001). Deze mesofiele bacteriën zijn in staat te groeien bij temperaturen van 20 tot 37°C (Shimaya & Hashimoto, 2011). De identificatie van deze AOB wordt bewerkstelligd door het DNA te onderzoeken op aanwezigheid van het gen ammoniak mono-oxygenase (*amoA*) dat codeert voor de subeenheid AMO, het essentiële enzym voor de omzetting van NH_3 tot NH_2OH (Ke et al., 2013).

2.1.2 Ammoniumoxiderende archaea

Ammoniumoxiderende archaea (AOA) zijn diverse, wijd verspreide organismen die zowel leven in aquatische als terrestrische omgevingen (Hallam et al., 2006; Treusch et al., 2005). Ze blijken bovendien meer voorkomend te zijn dan AOB (Coolen et al., 2007; Lam et al., 2007). De eerst ontdekte, geïsoleerde, marine, aerobe, ammoniumoxiderende archaeon was *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke et al., 2005).

Deze organismen hebben mede het gen in hun DNA dat codeert voor AMO, maar dit is minder eenduidig bepaald dan bij AOB. C. L. Zhang et al. (2008) verdeelden de *amoA* sequenties in 2 clusters: A en B. Oorspronkelijk werden AOA ingedeeld in de Crenarchaeota op basis van hun 16S rRNA fylogenie (C. L. Zhang et al., 2008), maar tijdens het onderzoek van Spang et al. (2010) werd gesuggereerd dat deze organismen tot een nieuw fylum behoren, de Thaumarchaeota.

Vele archaea worden gekenmerkt door een overlevingsvermogen in extreme condities zoals hoge temperaturen. Hun tolerantie is te wijten aan de aanwezigheid van glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs), membraanlipiden die opgebouwd zijn uit een aantal cyclopentyl ringen (Schouten et al., 2007). Crenarchaeol is een voorbeeld van een GDGTs die gevonden wordt in celmembranen van mesofiele Crenarchaeota en werd voorgesteld als biomerker voor ammoniumoxidatie bij AOA (de la Torre et al., 2008; Schouten et al., 2007). Dit bleek echter niet algemeen geldig te zijn aangezien het voorkomen van deze component in het celmembraan van AOA mede afhankelijk is van andere factoren zoals pH en lage pH zal de vorming ervan inhiberen (Pearson et al., 2008).

2.1.3 Nichedifferentiatie

AOA kunnen extreme condities overleven zoals reeds vermeld in sectie 2.1.2 (deel 1). De diversiteit, abundantie en verspreiding van AOA is gerelateerd aan fysisch-chemische factoren, maar de exacte voorspelling van aanwezigheid van soorten in bepaalde omstandigheden is niet mogelijk (Francis et al., 2005; He et al., 2007). Verschillende onderzoeken tonen aan dat AOA een significante rol spelen bij nitrificatie op plaatsen met lage zuurstofconcentratie (Coolen et al., 2007; Erguder et al., 2009; Treusch et al., 2005). Erguder et al. (2009) breidden deze significante rol uit naar andere omgevingscondities zoals lage nutriëntenconcentratie, lage pH en aanwezigheid van sulfide.

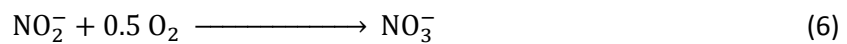
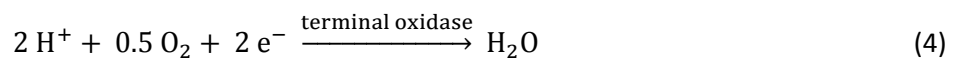
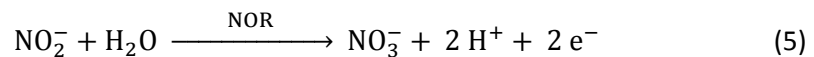
2.1.4 Thermofiele ammoniumoxiderende organismen

Nitrificatie in thermofiele condities vindt in de natuur plaats in onder meer warmwaterbronnen en composthoppen. Gecultiveerde gemeenschappen worden weergegeven in Tabel 1. AOA zijn in staat te

overleven in extreme omgevingscondities zoals hoge temperatuur, maar men is er eveneens in geslaagd AOB, die kunnen nitrificeren in thermofiele condities, op te kweken. In de praktijk blijkt cultivatie van thermofiele AOB moeilijker, nochtans worden deze species wel waargenomen bij identificatie van micro-organismen in thermofiele omgevingen (Tabel 2).

2.2 Nitratatie

De oxidatie van NO_2^- tot NO_3^- wordt nitratatie genoemd en wordt gekatalyseerd door nitriet oxidoreductase (NOR) (5) (Bock & Wagner, 2013). Deze reactie levert 2 elektronen en deze kunnen mede gebruikt worden in vergelijking (4) om energie te genereren, resulterend in opname van zuurstof.



Nitrietoxiderende organismen, met uitzondering van *Nitrobacter*, zijn obligaat lithotrofen aangezien nitriet hun enige energiebron is (Bock & Wagner, 2013). Er moet wel opgemerkt worden dat deze organismen competitie hebben voor nitriet met denitrificerende bacteriën en anaerobe ammonium oxiderende (anammox) bacteriën (Vlaeminck et al., 2010) en competitie voor zuurstof met AOA, AOB en heterotrofe bacteriën (Liu et al., 2008). De competitie tussen AOB en nitrietoxiderende bacteriën (NOB) voor zuurstof bevoordeelt AOB bij lage zuurstofconcentraties aangezien NOB een lagere affiniteit voor O_2 hebben en dus een hogere zuurstof saturatie constante K'_{NOB} ($1.4 \text{ g O}_2 \text{ m}^{-3}$) in vergelijking met AOB ($K'_{\text{AOB}} = 0.99 \text{ g O}_2 \text{ m}^{-3}$) (Ciudad et al., 2006).

2.2.1 Nitrietoxiderende bacteriën

In vergelijking met AOB zijn NOB Gram-negatieve bacteriën die fylogenetisch meer verspreid zijn (Koops & Pommerening-ro, 2001). Identificatie van deze organismen is mogelijk door het 16S rRNA gen te onderzoeken (Edwards et al., 2013). De meest voorkomende genera zijn *Nitrospira* (Nitrospirae), *Nitrobacter* (Proteobacteria, subklasse α), *Nitrococcus* (Proteobacteria, subklasse γ) en *Nitrospina* (Proteobacteria, subklasse δ) (Edwards et al., 2013). In waterzuiveringsinstallaties blijkt *Nitrospira* het dominante genus te zijn (Juretschko et al., 1998; Schramm et al., 1998).

2.2.2 Thermofiele nitrietoxiderende organismen

In Tabel 1 worden enkele thermofiele nitrietoxiderende organismen weergegeven. Deze waarnemingen zijn echter tegenstrijdig met de gerapporteerde optimale groeitemperatuur voor *Nitrospira* (30 tot 35 °C), in tegenstelling tot deze van *Nitrobacter* (30 tot 45 °C), wat de groei van *Nitrobacter* lijkt te bevoordelen bij hoge temperaturen (Blackburne et al., 2007b). Grunditz and Dalhammar (2001) vermelden 38 °C als optimale temperatuur voor *Nitrobacter*. Maar zoals reeds vermeld in sectie 2.2.1 (deel 1) blijkt *Nitrospira* steeds het dominante genus te zijn voor nitrietoxidatie, eveneens bij reactoren werkend bij 30 °C (Schramm et al., 1998).

Tabel 1: Samenvattende tabel van thermofiele nitrificerende organismen, geïsoleerd of gecultiveerd vanuit natuurlijke thermofiele omgevingen.

Organisme	Type	T _{opt} (°C)	Oorsprong	Referentie
<i>Bacillus</i> sp. strain T3	Heterotrofe AOB	50 °C	Compost	Shimaya and Hashimoto 2011
<i>Nitrosomonas</i> sp. JPCCT2	AOB	48 °C	Actief slib, thermische elektriciteitscentrale	Itoh et al. 2013
<i>Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii</i>	AOA	65-72 °C	Terrestrische warmwaterbron (Verenigde Staten)	de la Torre et al. 2008
<i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i>	AOA	46 °C	Terrestrische warmwaterbron (Siberië)	Hatzenpichler et al. 2008
<i>Candidatus Nitrosotenuis uzonensis</i>	AOA	46 °C	Terrestrische warmwaterbron (Kamchatka, Rusland)	Lebedeva et al. 2013
<i>Nitrososphaera viennensis</i> gen. nov., sp. nov.	AOA	42 °C	Tuin (Oostenrijk)	Stieglmeier et al. 2014
<i>Nitrospira calida</i>	NOB	46-52 °C	Warmwaterbron (China)	Edwards et al. 2013; Lebedeva et al. 2011
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	NOB	39 °C	Warmwaterbron (Armenië)	Edwards et al. 2013; Ehrich et al. 1995
<i>Nitrolancetus hollandicus</i>	NOB	40 °C	Continu geroerde tank reactor	Sorokin et al. 2012; Vejmelkova et al. 2012

Tabel 2: Tabel met gedetecteerde nitrificerende bacteriën in thermofiele omgevingen.

Organisme	Type	T _{omgeving} (°C)	Oorsprong	Referentie
<i>Nitrosomonas europaea</i>	AOB	70 °C	Compost	Yamamoto, Ottawa, and Nakai 2010
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	AOB	70 °C	Compost	Yamamoto, Ottawa, and Nakai 2010
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	AOB	40 °C	Integrated fixed film activated sludge	Kim et al. 2010; Shore et al. 2012

3 Adaptatie mesofiele nitrificeerders

Microbiële processen in thermofiele condities (tussen 40 en 60 °C; Henze et al. 2008) leveren tal van voordelen op (zie sectie 1.2, deel 1), waardoor gezocht wordt naar methoden om dit in de praktijk toe te passen. Thermofiele nitrificatie werd in het verleden reeds getest door de transitie van mesofiele bacteriën naar hogere temperaturen te bewerkstelligen. Hierbij werden verschillende soorten reactoren getest of werden bacteriën blootgesteld aan stresserende condities. In deze sectie worden onder meer thermotolerantie in batchtesten en in een sequencing batch reactor (SBR), temperatuurschok in een moving bed biofilm reactor (MBBR) en zoutstress besproken.

3.1 Tolerantie aan thermofiele temperaturen

Lopez-Vazquez et al. (2014) bestudeerden de tolerantie van mesofiele bacteriën uit een olieraffinaderij, reeds werkend op 34 °C, voor thermofiele temperaturen door tijdens verschillende batchtesten micro-organismen bloot te stellen aan diverse temperaturen, variërend van 35 tot 55 °C. Dit experiment gaf gunstige resultaten aangezien bacteriën een optimale oxidatiesnelheid behaalden bij 50°C. Deze bevindingen werden echter bekomen bij testen van korte duur (24 u) waardoor de geldigheid voor langdurende experimenten niet gegarandeerd kan worden.

Een gelijkaardig, maar langdurig experiment (55 d) in een SBR en met alternatief slib, werd uitgevoerd in Vandekerckhove (2014). De temperatuur werd na een stabilisatieperiode geleidelijk opgedreven tot 45 °C, maar bij deze temperatuur was de nitrificerende activiteit tot een minimum gedaald.

3.2 Adaptatie na temperatuurschok

Shore et al. (2012) onderzochten thermofiele nitrificatie met behulp van drie parallelle MBBR reactoren, gevuld met BioPortz carriers. Elke reactor werd met hetzelfde slib geïnoculeerd en geopereerd aan een temperatuur van 30 °C. In een tweede fase werd de temperatuur opgedreven naar respectievelijk 35, 40 en 45 °C. Deze opdrijving zorgde initieel voor inhibitie in de reactoren op 40 en 45 °C. Door de lange duur van het experiment (116 d) konden micro-organismen in de 40 °C-reactor adapteren en behaalden ze opnieuw hun oorspronkelijke NH₃-N verwijderingsefficiëntie (98.1 %). Dit in tegenstelling tot de micro-organismen in de 45 °C-reactor, die geen activiteit meer vertoonden op deze temperatuur. Aangezien 35 °C de optimale temperatuur voor nitrificatie is, werd in deze reactor geen inhibitie opgemerkt.

3.3 Adaptatie door middel van zoutstress

Bij het bespreken van deze methode moet opgemerkt worden dat in literatuur tegenstrijdige conclusies gemaakt worden. Moussa et al. (2006) verklaarden deze tegenstrijdigheid door verschillende systeem configuraties en instabiliteit van experimentele condities, gerelateerd aan pH, temperatuur en inhiberende componenten. Daarnaast beïnvloeden ook de manier van introductie van zout in het systeem en de aanwezige species de resultaten.

Zoutstress is toxisch voor nitrificeerders (Lapara & Alleman, 1999), maar door accumulatie van osmoprotectantia als reactie op osmotische stress kunnen micro-organismen overleven in deze omstandigheden. Deze componenten beschermen de cel, naast zoutstress, ook tegen hoge temperaturen (Welsh, 2000). Courtens, Boon, et al. (2014) testten, op basis van deze bevindingen,

nitrificatie op hoge temperaturen in batchtesten en in een langdurige reactortest door micro-organismen te onderwerpen aan zoutstress.

Het effect van zouttoevoeging op de microbiële activiteit van specifieke AOB en NOB werd bepaald tijdens batchtesten. Er kan geconcludeerd worden dat de activiteit van NOB daalt door zouttoevoeging, terwijl het een positief effect heeft op de activiteit van AOB. Het positieve effect is echter van korte duur, want na 48 uur kon het effect van zoutstress niet meer gedetecteerd worden. Daarnaast werden 2 parallelle fixed bed reactoren opgesteld, enerzijds een controle reactor, anderzijds een reactor onderworpen aan zoutstress ($9.5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$). De temperatuur werd in beide reactoren stapsgewijs opgedreven. Men kwam tot het besluit dat zoutstress een positief effect heeft op thermotolerantie, aangezien micro-organismen in de zoutreactor minder snel geïnhibeerd werden door temperatuurstijging en finaal nitrificeerden bij hogere reactortemperaturen. Bijgevolg kan deze methode gebruikt worden bij adaptatie van mesofiel slib om thermofiele nitrificatie te bewerkstelligen.

4 Reactoren

In deze thesis wordt onderzoek gevoerd naar thermofiele nitrificatie en hierbij worden 2 verschillende reactoren met elkaar vergeleken. Enerzijds is er een gesuspenseerd systeem, meer bepaald een sequencing batch reactor (SBR) en anderzijds een biofilmgebaseerd systeem. Bij het laatst genoemde systeem werd gekozen voor een moving bed biofilm reactor (MBBR). De hypothese stelt dat vastgehechte biomassa meer bestand is tegen extreme condities zoals hoge temperaturen, aangezien literatuur vermeldt dat gebruik van carriers leidt tot een stabielere gemeenschap die minder gevoelig is aan veranderingen in omgevingscondities (Kulikowksa et al., 2009).

4.1 Sequencing batch reactor

Een SBR werkt volgens een cyclisch patroon, bestaande uit 4 fases: voedingsfase, reactiefase, bezinkingsfase en afvoerfase (Nadarajah et al., 2007; Tripathi & Grant Allen, 1999). Tijdens de voedingsfase wordt een hoeveelheid afvalwater toegevoegd aan de reactor, die op dat moment reeds een hoeveelheid slib en water bevat. Gedurende de 2^e fase wordt de volledige massa gemengd en belucht, zodat alle reacties kunnen plaatsvinden waardoor onder meer COD (chemische zuurstofvraag) en NH_4^+ uit het afvalwater respectievelijk verwijderd en geoxideerd worden. Vervolgens worden de menging en beluchting uitgeschakeld, zodat de aanwezige micro-organismen kunnen bezinken en een hoeveelheid gezuiverd water kan worden uitgepompt. Nadien kan het hele proces herhaald worden. De hoeveelheid biomassa in de reactor wordt constant gehouden door de overmaat op elk moment te verwijderen (U.S. Environmental Protection Agency, 1999).

Het Amerikaanse EPA verslag van september 1999 (U.S. Environmental Protection Agency, 1999), beschrijft enkele voor- en nadelen van deze technologie. Slechts 1 tank wordt gebruikt waarin zowel homogenisatie, biologische behandeling, primaire en secundaire bezinking plaatsvinden. Dit drukt de kosten aanzienlijk. Daarnaast kent de SBR-reactorconfiguratie een grote operationele flexibiliteit en controle, waardoor een groot bereik aan afvalwaters gezuiverd kan worden. Ten gevolge van het gebruik van slechts 1 tank, is het volledige proces gesofisticeerder onder meer in timing van verschillende fases. Tevens kan de toevoer van zuurstof verstopt geraken waardoor de werking van dit systeem aanzienlijk kan afnemen.

4.2 Moving bed biofilm reactor

4.2.1 Technologie

In 1989 is de eerste MBBR, ontwikkeld door de Noorse Universiteit voor Wetenschap en Technologie en het Noorse bedrijf AnoxKaldnes AS, in gebruik genomen in Noorwegen (Johnson et al., 2013). Sindsdien kent deze waterbehandelingstechnologie een groot succes. De flexibele technologie geniet van de voordelen van enerzijds een vastgehechte biofilm op carriers en anderzijds een gesuspendeerde groei (Barwal & Chaudhary, 2014). Gebruik van carriers leidt tot de ontwikkeling van een stabielere gemeenschap die minder gevoelig is aan toxische omstandigheden, metabolische producten en veranderingen in omgevingscondities (Kulikowska et al., 2009). Een bijkomend interessant voordeel is de eenvoudige omschakeling van een bestaande installatie, bijvoorbeeld SBR, naar een MBBR (S. Zhang et al., 2013).

Afvalwaterzuivering met een MBBR is een continu proces waarbij de inhoud van de tank gemixt wordt, wat resulteert in het vermijden van dode zones en verstoppingen waardoor backwashing overbodig is (Barwal & Chaudhary, 2014; Zafarzadeh et al., 2010; S. Zhang et al., 2013). De carriers verlaten de tank niet door gebruik te maken van een zeef bij het uitpompen (Rusten et al., 2006). Hierdoor is de slibretentietijd (SRT) aanzienlijk hoger in vergelijking met actief slib gebaseerde systemen en is recirculatie van slib overbodig (Shore et al., 2012; Zafarzadeh et al., 2010). De hoeveelheid carriers in de reactor wordt weergegeven met een vulratio en deze verhouding stijgt met een dalend specifiek oppervlak (Skerjanec et al., 2009). Ten gevolge van predatie en wrijving zullen micro-organismen prefereren om binnenin de carrier te groeien, maar bij volgroeide carriers kan de diffusie van zuurstof en substraat tot in de kern gelimiteerd zijn (Levstek & Plazl, 2009; McQuarrie & Boltz, 2011).

4.2.2 Carrier

Er bestaat een ruime keuze aan carriers, gebruikt in een MBBR. Alom bekend en vaak gebruikt pakkingsmateriaal, is Kaldnes K1 carrier materiaal. Minder bekend en recent ontwikkeld, is polyvinyl alcohol (PVA) gel (Kuraray, Japan) en het heeft veel potentieel. De keuze bepaalt het effectief specifiek oppervlak in de reactor, aangezien dit afhankelijk is van de vorm van de gebruikte carrier. In literatuur geeft men vaak verwijderingssnelheden weer in $\text{mg NH}_4\text{-N}$ per volume-eenheid en tijdseenheid of $\text{mg NH}_4\text{-N}$ per oppervlakte-eenheid en tijdseenheid. Deze weergave maakt vergelijking moeilijk, aangezien geen indicatie gegeven wordt van de hoeveelheid biomassa aanwezig in de reactor. Specifieke activiteiten in functie van de biomassaconcentratie daarentegen, geven een eenduidig beeld van de hoogste activiteit.

Tabel 3 geeft de vergelijking weer van verschillende carriers: Kaldnes K1 carrier, BioPortz en PVA gel.

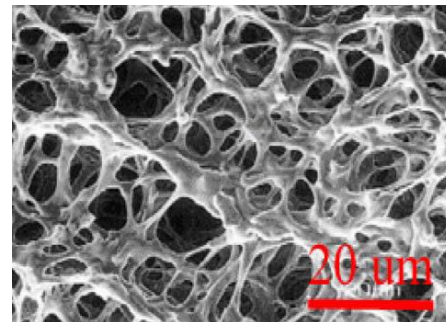
Tabel 3: Samenvatting van eigenschappen van Kaldnes K1 carrier, BioPortz en PVA-gel carrier (Entex Technologies, 2010; Levstek & Plazl, 2009; Shore et al., 2012; Skerjanec et al., 2009).

	Kaldnes K1	BioPortz	PVA gel
Specifiek oppervlak (m² m⁻³)	500	580	2500
Soortelijk gewicht (-)	0.95	0.96	1.025
Maximale vulratio (%)	70	50	15
Materiaal	Polyethyleen	Polyethyleen	Polyvinyl alcohol
Vorm	cilindrisch	cilindrisch	sferisch

In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van poreuze PVA carriers (Figuur 2, Figuur 3) waarbij micro-organismen beschermd worden voor predatie en wrijving indien deze binnenin de carriers groeien. Een bijkomend gevolg van de porositeit is de aanwezigheid van een grote hoeveelheid water in het pakkingmateriaal, waardoor de permeabiliteit van zuurstof en nutriënten naar de micro-organismen begunstigd wordt. Een essentiële eigenschap van dit PVA is de onoplosbaarheid ervan in water en tot op heden is er geen bewijs voor de biodegradeerbaarheid ervan.



Figuur 2: PVA-gel carriers voor gebruik (Levstek et al., 2010).



Figuur 3: Microscopische structuur van het oppervlak van een PVA-gel carrier (Levstek et al., 2010).

4.3 Effect van temperatuur op reactorcondities en -operatie

4.3.1 SBR

De invloed van temperatuur op de kinetiek van micro-organismen wordt beschreven door de van 't Hoff-Arrhenius vergelijking (7) (Sin et al., 2008):

$$k = Ae^{-E_a/(RT)} \quad (7)$$

k stelt de snelheidsconstante van de chemische reactie voor, T de absolute temperatuur in Kelvin, E_a de activatie-energie, R de universele gasconstante en A een prefactor. Een hogere temperatuur resulteert in een hogere snelheid van een chemische reactie, waardoor geselecteerd kan worden voor een kleinere reactor en mede een lagere kapitale kost (Krishna & Van Loosdrecht, 1999). Arrhenius modelleerde de groeisnelheid ook als een exponentieel stijgende parameter met de temperatuur, maar mesofiele micro-organismen worden geïnhibeerd door hoge temperaturen (> 40 °C). Een

gewijzigd model, het Ratkowsky-model (8), met aandacht voor inhibitie op hoge temperaturen wordt daarom geprefereerd om de specifieke groeisnelheid voor te stellen (Ratkowsky et al., 1983):

$$r(T) = (b(T - T_{\min}))^2 (1 - \exp(c(T - T_{\max}))) \quad (8)$$

r stelt de specifieke groeisnelheid voor, T de temperatuur in graden Celsius, T_{\min} en T_{\max} respectievelijk de minimale en maximale temperatuur waarop activiteit waargenomen wordt in graden Celsius en b en c zijn modelconstanten.

Een hogere temperatuur leidt bijkomend tot een lagere oplosbaarheid van zuurstof in water, wat een negatief effect heeft op stikstofverwijdering (Jahren et al., 2002; Salvetti et al., 2006). Door een lage opbrengst coëfficiënt van thermofiele micro-organismen in vergelijking met deze van mesofiele micro-organismen, zullen de eerstgenoemde meer substraat omzetten tot CO_2 , waardoor meer beluchting noodzakelijk is (Lapara & Alleman, 1999).

Het grote probleem bij thermofiele, gesuspendeerde processen is een slechte bezinking, wat cruciaal is voor een goede werking van een SBR (Lapara & Alleman, 1999; Suvilampi & Rintala, 2002). Deze complicatie komt tot uiting in een hogere turbiditeit van het effluent en een hogere SVI bij hogere temperaturen. Het laatstgenoemde effect is het gevolg van een hoger gehalte aan filamenten waardoor aggregatie belemmerd wordt (Krishna & Van Loosdrecht, 1999; Liao et al., 2011). Vogelaar et al. (2005) verklaren deze slechte flocculatie ook door elektrostatische krachten, waardoor slib een grotere fractie aan kleine partikels bevat die zeer gevoelig zijn voor wrijvingskrachten.

4.3.2 MBBR

De reactiesnelheid en oplosbaarheid van zuurstof zijn temperatuurafhankelijk zoals reeds vermeld in sectie 4.3.1 (deel 1). Een bijkomende factor in een biofilmgebaseerd systeem is de diffusiecoëfficiënt die mede afhankelijk is van de temperatuur. Een positief verband wordt waargenomen tussen de diffusiecoëfficiënt en de temperatuur, in tegenstelling tot een invers verband tussen oplosbaarheid en temperatuur. Diffusie is significant bij de besproken technologie, aangezien zowel substraat als zuurstof in de kern van de carriers moet diffunderen. Het positieve effect van de diffusiecoëfficiënt bij thermofiele condities zou moeten leiden tot een zuurstofoverdracht die minstens even hoog is als deze bij mesofiele temperaturen (Jahren et al., 2002). Shore et al. (2012) onderzochten de hypothese waarbij vastgehechte bacteriën beter beschermd zijn tegen hogere temperaturen en aangezien nitrificatie plaatsvond bij hogere temperaturen dan de optimale, is deze theorie bevestigd.

4.4 Vergelijking SBR-MBBR

In onderstaande tabel (Tabel 4) wordt de vergelijking weergegeven tussen een SBR en een MBBR

Tabel 4: Samenvattende tabel met voor- en nadelen bij de vergelijking van een SBR en een MBBR.

	SBR	MBBR
Micro-organismen	Gesuspendeerd	Biofilmgebaseerd
Werking	Cyclisch	Continu
SRT (relatief)	Kleiner	Groter
Mogelijke belasting	Lager	Hoger
Omvorming bestaande systemen	Niet gerapporteerd	Gemakkelijk
Robuustheid (relatief)	Minder	Meer
Investeringskost (CAPEX)	Meer	Minder
Operationele kost (OPEX)	Minder	Meer

Een grotere SRT bij een MBBR wordt bekomen door de aanwezigheid van een type zeef, zodat carriers de tank niet kunnen verlaten (Shore et al., 2012; Skerjanec et al., 2009). Vermits ammoniumoxiderende bacteriën relatief traag groeien en dus nood hebben aan een grote SRT, is een MBBR bijzonder geschikt voor het nitrificatie proces (Almstrand et al., 2014). Vastgehechte bacteriën kunnen hogere influentconcentraties omzetten en zijn ook beter bestand tegen toxische omstandigheden en veranderingen in de omgevingscondities (Koupaie et al., 2011; Kulikowksa et al., 2009; Zafarzadeh et al., 2010). Lackner and Horn (2013) concludeerden hetzelfde bij een plotse temperatuurdaling in single stage nitritation-anammox SBR en MBBR, waarbij de laatstgenoemde robuuster blijkt in termen van verstoringen. Algemeen heeft een MBBR alle voordelen van een actief slib systeem en een conventioneel fixed bed systeem zonder de nadelen, maar door de continue operatie blijken de operationele kosten hoger te zijn dan in de SBR (Zafarzadeh et al., 2010).

5 Doelstelling

De hoofddoelstelling van deze thesis was het bereiken van thermofiele nitrificatie in reactoren via transitie van mesofiel slib naar hogere temperaturen. Dit werd bewerkstelligd via een graduele lineaire temperatuuropdrijving. Simultaan met de hoofddoelstelling werden in deze thesis twee systemen vergeleken: een gesuspendeerd – en een biofilmgebaseerd systeem. Praktisch werd er gekozen voor een sequencing batch reactor als gesuspendeerd systeem en een moving bed biofilm reactor met PVA-carriers als biofilmgebaseerd systeem. Alvorens de temperatuur op te drijven, stabiliseerde het ABIL-slib in beide reactoren en werd een biofilm gevormd op PVA-carriers. Gelijktijdig werd een methode geoptimaliseerd om biomassa op PVA-carriers te bepalen en zodoende de specifieke activiteiten in de reactoren te vergelijken. Tijdens de temperatuuropdrijving werd de adaptieve capaciteit van micro-organismen in beide reactoren en hun gevoeligheid voor vrij ammoniak getest in batchtesten. Met behulp van de high-throughput methode konden veel verschillende condities gelijktijdig getest worden en is het gebruik van chemicaliën geminimaliseerd. Finaal werd de microbiële gemeenschap zowel tijdens de stabilisatiefase als het effectieve experiment opgevolgd om adaptatie of selectie te concluderen.

DEEL 2: MATERIALEN EN METHODEN

1 Reactoren: sequencing batch reactor versus moving bed biofilm reactor

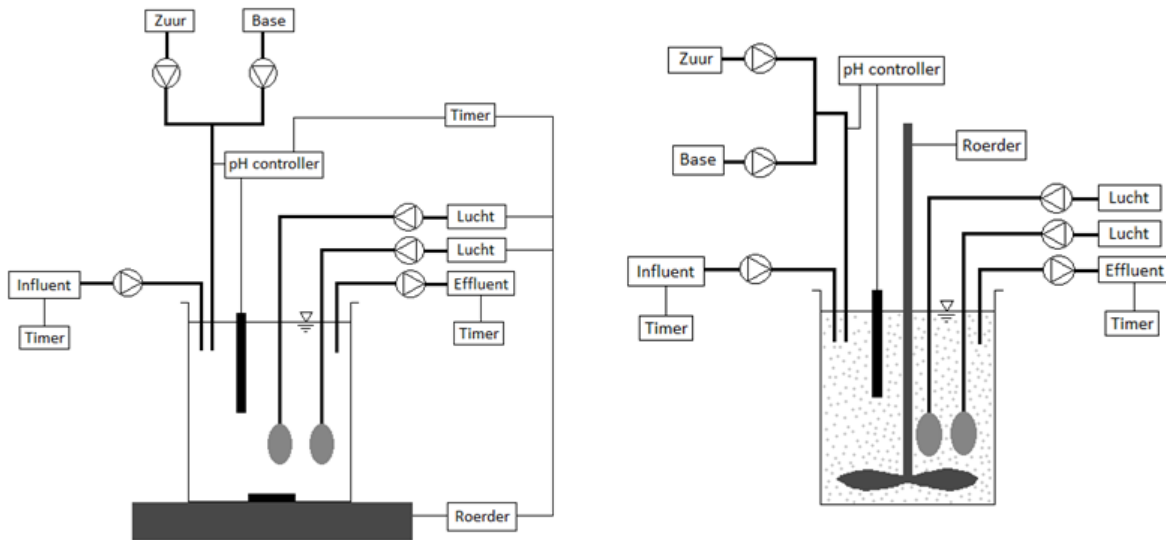
1.1 Reactordesign

In deze thesis werden 2 reactoren, een sequencing batch reactor (SBR) en een moving bed biofilm reactor (MBBR), parallel opgesteld en vergeleken. Er werd geopteerd voor een zo identiek mogelijke opstelling (volume, voeding strategie, pH range...) om het effect van reactortype maximaal weer te geven.

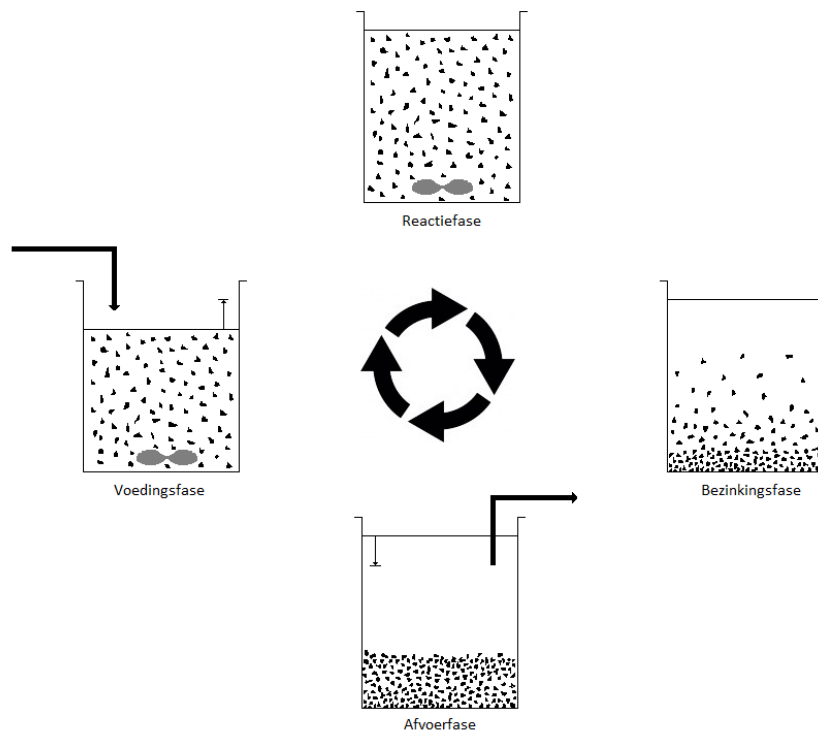
1.1.1 SBR

De SBR werd geselecteerd als prototype van een gesuspendeerd systeem. Figuur 4 (links) geeft een schematische voorstelling weer en Figuur 5 geeft een overzicht van de verschillende fases van de cyclus, gestuurd door verschillende timers. Aan de start van elke cyclus werden de magnetische roerder en de beluchting, via een luchtpomp en beluchtingsteentje, geactiveerd. Vervolgens werd het influent toegevoegd via een peristaltische pomp (samenstelling zie sectie 1.2, deel 2). Deze toevoeging kan eenmalig gebeuren of verspreid worden over meerdere voedingsfases in een cyclus. In dit onderzoek werd geopteerd voor optie 2, zodat voeding stelselmatig toegevoegd werd. Op deze manier worden grote concentratieveranderingen vermeden. In de praktijk kwam dit neer op 2 keer 25 en 1 keer 22 minuten voeden en 3 reactiefases van gemiddeld 45 minuten. Tijdens de reactiefase werd de reactor steeds gemengd en belucht. Na deze fases werd, met behulp van een timer, de toevoer van lucht en het mixen uitgeschakeld, waardoor slib kan bezinken in de gelijknamige fase, de bezinkingsfase. De cyclus werd beëindigd met het uitpompen van effluent tijdens de afvoerfase. Soms wordt nog een rustfase ingelast vooraleer nieuwe voeding toegevoegd wordt, maar dit werd in dit onderzoek achterwege gelaten.

Het bicarbonaat in het influent doet de pH stijgen terwijl nitrificatie een verzurend proces is. Theoretisch kan dit elkaar uitmiddelen en leiden tot stabiele pH-condities, maar er werd geopteerd voor een pH controle tussen 6.5 en 7.25 door het toevoegen van 0.1 M HCl of 0.1 M NaOH (Consort pH probe, gekoppeld aan een Prominent controller). De eigenlijke reactor was een dubbelwandig reactievat om de temperatuur te regelen. Doorheen de wand werd water gestuurd, dat in een warmwaterbad (Julabo MA-4) op temperatuur gehouden werd.



Figuur 4: Schematische voorstelling van de SBR (links) en de MBBR (rechts).



Figuur 5: Schematische voorstelling van de verschillende fases van de cyclus van de SBR.

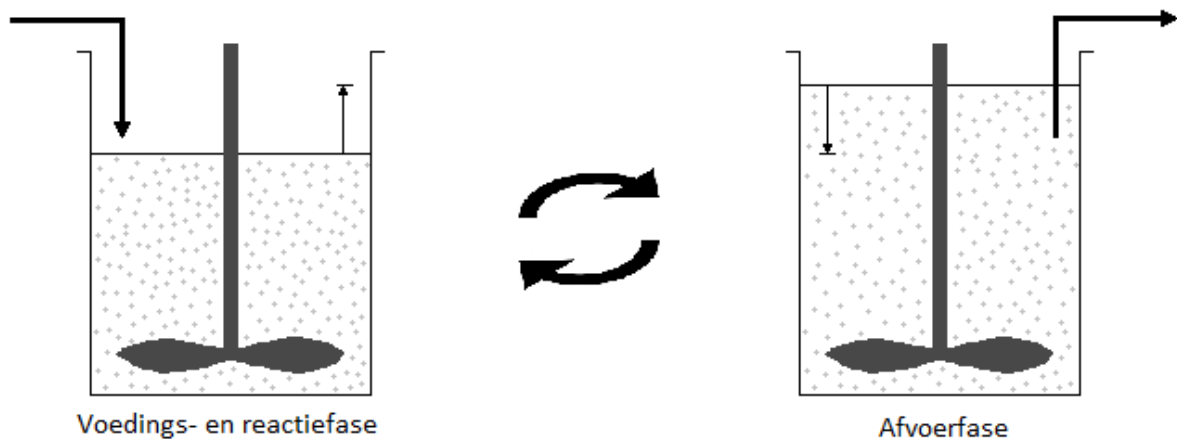
1.1.2 MBBR

Het biofilmgebaseerd systeem had een gelijkaardige opstelling als het gesuspendeerd systeem (Figuur 4, rechts). Influent en effluent werden op identieke momenten toegevoegd en verwijderd en dezelfde apparatuur (pH controller, luchtpompjes, warmwaterbad...) was aanwezig.

Het grote verschil met de SBR, was de aanwezigheid van PVA-carriers in de reactor. Levstek et al. (2010) vermelden een maximaal vulratio van 15% en dit werd ook geselecteerd in deze thesis. Voor

een reactor van 2 L komt dit neer op 300 mL carriers. Na het kwantificeren werden 5839 carriers aan de reactor toegevoegd. Om deze hoeveelheid in suspensie te houden, werd gebruik gemaakt van een mechanische roerder aangezien een magnetische roerder onvoldoende krachtig bleek om dit te bewerkstelligen.

Tijdens de stabilisatie van de reactor werd dezelfde cyclus opgelegd als bij de SBR. Op die manier werd voldoende gesuspendeerd slib in de reactor gehouden om groei op carriers mogelijk te maken. Op het moment dat activiteit op carriers aangetoond werd, werd selectie uitgevoerd door een grove zeef te bevestigen op de effluent tubing en menging en beluchting continu ingeschakeld te houden. Zo werd gesuspendeerd slib verwijderd en werden carriers in de reactor te houden. Figuur 6 geeft de uiteindelijke cyclus van de MBBR weer waarbij eerst influent toegevoegd werd, verdeeld over de volledige cyclus door 3 keer gemiddeld 25 minuten influent te pompen afgewisseld door 45 minuten reactie. De cyclus eindigde met het uitpompen van effluent zonder het stilleggen van menging/beluchting.



Figuur 6: Schematische voorstelling van de cyclus van de MBBR.

1.2 Parameters

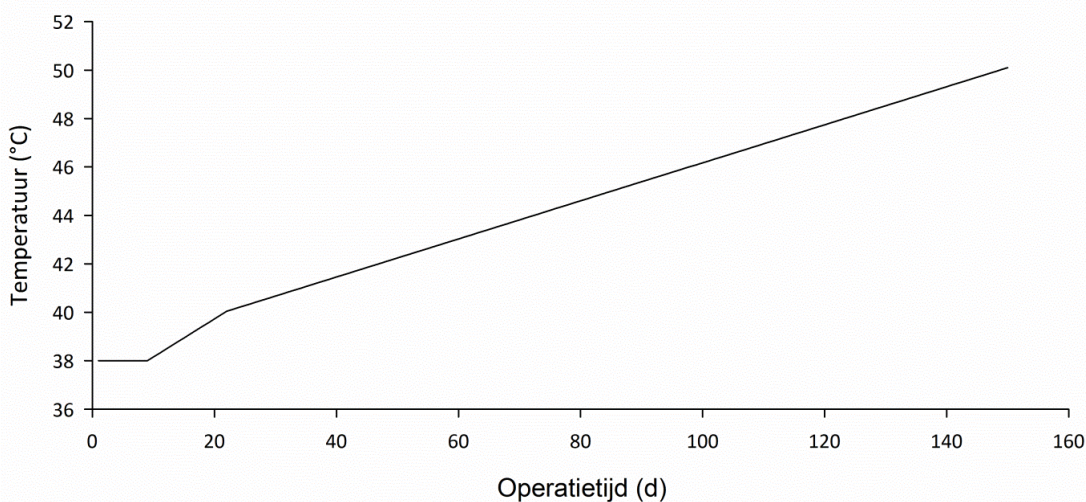
Tabel 5 geeft de operationele parameters weer voor beide reactoren. Deze zijn zeer gelijkaardig op enkele factoren na. Verschil in voedingsduur is te verklaren door een klein verschil in debiet van peristaltische pompen. De opzet van deze thesis is het verklaren van verschil in tolerantie voor hoge temperaturen tussen een gesuspendeerd en biofilmgebaseerd systeem, waardoor de aanwezigheid van PVA-carriers het cruciale verschil is.

Het influent van beide reactoren bestond uit ammoniumsulfaat ($0.05\text{-}1 \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$), bicarbonaat (NaHCO_3) en kaliumdiwaterstoffosfaat ($0.004 \text{ g } \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ L}^{-1}$). De toegevoegde bicarbonaatconcentratie was afhankelijk van de ammoniumconcentratie in het influent en diende om verzuring tegen te gaan.

Tabel 5: Operationele parameters voor de SBR en de MBBR.

	SBR	MBBR
Inoculum	ABIL-slib	ABIL-slib
Cyclusduur (min)	240	240
Voedingsfase (min)	72	78
Reactiefase (min)	133	127
Bezinkingsfase (min)	20	20
Afvoerfase (min)	15	15
Volumetrische uitwisselingsratio (%)	18	19
Werkvolume (L)	2	2
Debiet (L d ⁻¹)	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2
Hydraulische retentietijd (HRT) (d)	0.9	0.9
pH	6.9 ± 0.5	7.1 ± 0.3
Minimale bezinkingsnelheid (MSV) (m h⁻¹)	0.204	0.204
Aanwezigheid PVA-carriers	Nee	Ja

Beide reactoren waren gekoppeld aan hetzelfde circulerend thermostatisch warmwaterbad (Julabo MA-4). De test werd gestart bij 38 °C en na voldoende stabilisatie werd de temperatuur opgedreven. Vandekerckhove (2014) toonde aan dat een lineaire temperatuuropdrijving betere resultaten geeft dan een oscillerende, waardoor deze aanpak geselecteerd werd. Bovendien toonde dat onderzoek aan dat er geen problemen waren bij temperaturen lager dan 40 °C waardoor de temperatuur in dit experiment van 38 tot 40 °C opgedreven werd met 0.16 °C d⁻¹. Nadien werd deze snelheid gehalveerd om adaptatie toe te laten (Figuur 7). Bij een daling in activiteit in 1 reactor van minimaal 90%, werd de betreffende reactor losgekoppeld van het warmwaterbad om de activiteit op de bekomen temperatuur te herstellen. In de andere reactor werd de temperatuuropdrijving verdergezet.



Figuur 7: Temperatuurverloop van de reactoren. Oorspronkelijk steeg de temperatuur met 0.16 °C d⁻¹, maar na het bereiken van 40 °C, werd deze snelheid gehalveerd.

1.3 Inoculum

Vandekerckhove (2014) testte de toepasbaarheid van 4 mesofiele inocula met betrekking tot de thermotolerantie van elk slib. Dit onderzoek concludeerde dat ABIL (ammonium binding inoculum liquid) de beste gemeenschap had om testen op thermofiele temperaturen uit te voeren. Dit slib werd geselecteerd voor deze thesis en werd verkregen bij Avecom.

Aanvankelijk werd het inoculum bewaard op 4 °C en voor aanvang van de test werd het slib geactiveerd bij 34 °C. Na het aantonen van activiteit werd het inoculum (10 g VSS, vluchtige zwevende stoffen) verdeeld over de reactoren.

1.4 Performantie reactoren

Verschillende aspecten van de reactoren werden opgevolgd tijdens de operatie om de performantie ervan te bepalen. Dagelijks werd op het einde van een cyclus de zuurstofconcentratie bepaald om voldoende zuurstof in de reactoren te verzekeren. Daarnaast werd de pH gecontroleerd met een mobiele pH meter om de werking van de pH meter in de reactor te controleren. Indien nodig werd deze gekalibreerd. De temperatuur in de reactoren werd gemeten om zeker te zijn dat deze het gewenste niveau had. Tot slot werden, na kwalitatieve meting van NH_4^+ en NO_2^- met behulp van teststrips, influent- en effluentstalen genomen voor N-analyses (NH_4^+ , NO_2^- en NO_3^-). Met deze gegevens werd een stikstofbalans opgesteld, de volumetrische oxidatiesnelheid bepaald en mits de slibconcentratie gekend is, de specifieke oxidatiesnelheid berekend.

Tijdens de stabilisatieperiode werden regelmatig slibstalen genomen om VSS- en TSS-concentratie (totale zwevende stoffen) op te volgen. Bij het nemen van deze stalen werd vastgehechte biomassa initieel van de wand verwijderd met behulp van een spatel. Tijdens de temperatuuropdrijving werden op mijlpaaltemperaturen (38, 40, 42, 44, 46, 48 °C) de VSS-concentratie van de MBBR en de slibproductie, de slibretentietijd (SRT) en de slibvolume-index na 5 minuten (SVI_5) van de SBR bepaald. Daarnaast werden batchtesten uitgevoerd met slib uit de reactoren. Tot slot werden stalen genomen voor moleculaire analyses.

1.5 Batchtesten

Batchtesten werden uitgevoerd op reactortemperaturen 38, 40, 42, 44, 46 en 48 °C. Hierbij werd telkens slib uit de SBR genomen en verdund in een 96 well plaat, waarbij de verdunning (2.6, 5 of 20) afhankelijk was van de activiteit van het slib. Voor batchtesten met slib uit de MBBR werden carriers rechtstreeks uit de reactor in een buffer gebracht. Hierbij werd gebruik gemaakt van 24-well platen met een volume van 1.5 mL of 2.5 mL bufferoplossing, afhankelijk van de activiteit. Elke plaat werd afgeschermd met parafilm om voldoende zuurstof in elke well te verzekeren en evaporatie te minimaliseren. Bij elke test en elke geteste temperatuur werd telkens een abiotische reeks mede geanalyseerd om ammoniumstripping te kwantificeren. Elke activiteitstest werd in zesvoud uitgevoerd.

De bufferoplossing was samengesteld uit enerzijds een fosfaatbuffer en anderzijds bicarbonaat. De fosfaatbuffer werd gemaakt met KH_2PO_4 en K_2HPO_4 en een finale concentratie van 2 g P L^{-1} werd gerealiseerd. De toegevoegde bicarbonaat had een finale concentratie van 1 g L^{-1} . Tot slot werd aan de buffer nog NH_4^+ of NO_2^- , onder de vorm van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en NaNO_2 , toegevoegd om de

desbetreffende activiteit te kunnen opvolgen. De finale concentratie aan NH_4^+ of NO_2^- bedroeg 60 mg N L^{-1} .

Om 96- en 24-well platen op temperatuur te houden en te schudden aan 600 rpm, werd gebruik gemaakt van MB100-4A thermoshakers.

1.5.1 Optimale temperatuur

Om de adaptatiecapaciteit van de desbetreffende gemeenschap in de reactoren te testen, werden op mijlpaaltemperaturen activiteiten bepaald bij de heersende reactortemperatuur, 2 graden lager en 2 graden hoger. Stalen werden genomen op verschillende tijdstippen en geanalyseerd met de high-throughput methode. Volumetrische activiteiten werden bepaald door de daling in NH_4^+ en NO_2^- op te volgen (minimum 4 staalnamepunten). Met de kennis van VSS-concentratie in de reactor en de gebruikte verdunningsfactor of de VSS-concentratie op carriers, kon de specifieke activiteit bepaald worden. Door resultaten bij optimale buffercondities op verschillende temperaturen te vergelijken, kon de optimale temperatuur voor het slib bepaald worden.

1.5.2 Gevoeligheid voor vrij ammoniak

De bepaling van gevoeligheid voor vrij ammoniak was een operatiestrategie om nitrietaccumulatie in de reactoren te vermijden. Hierbij moest de oxidatiesnelheid van NOB telkens groter zijn dan deze van de AOA en AOB bij een bepaalde vrij-ammoniakconcentratie.

Zowel ammonium- als nitrietoxideerders werden getest op hun gevoeligheid voor vrije ammoniak. Dit werd bewerkstelligd door aan nitrietbuffers een concentratie NH_4^+ toe te voegen, variërend van 0 tot 200 mg N L^{-1} . Voor ammoniumbuffers kwam dit neer op een stijging van de ammoniumconcentratie in de bufferoplossing. Hier werd mede getest op concentraties tot 200 mg N L^{-1} . De activiteit en daarmee samengaannde gevoeligheid aan vrij ammoniak werden bepaald op de heersende reactortemperatuur.

2 Analytische methoden

2.1 Ammonium

2.1.1 Teststrips

Met behulp van eenvoudige teststrips (Merck) werd de kwaliteit van het effluent indicatief bepaald. Het meetbereik van deze teststrips varieert van 7.8 tot 310 mg N L^{-1} .

2.1.2 Nessler

De exacte bepaling van ammonium in influent en effluent werd verwezenlijkt met een methode die gebaseerd is op NBN T 91-251: 'Wateranalysemethoden : Bepaling van ammoniakale stikstof. Rechtstreekse fotometrische methode met Nessler reagens.', 1977. In deze methode wordt gebruik gemaakt van 2 reagentia. Reagens A is opgebouwd uit kaliumnatriumtartaat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en capteert interfererende elementen zoals ijzer en mangaan. Reagens B wordt samengesteld uit natriumhydroxide (NaOH), kaliumjodide (KI) en kwikjodide (HgI_2). Natriumhydroxide leidt tot het basisch milieu, noodzakelijk voor complexvorming van ammonium met het Nessler reagens, K_2HgI_4 . Bij de laatstgenoemde reactie wordt een geel complex gevormd en de intensiteit van de gevormde

kleur, gemeten bij een golflengte van 425 nm, is lineair gecorreleerd met de concentratie ammonium in het staal. Het meetbereik van deze methode is 0.1 tot 5 mg N L⁻¹. Sommige organische alifaten en aromatische componenten kunnen leiden tot nefaste interferentie.

2.1.3 High-throughput

De high-throughput methode wordt gekenmerkt door een groot aantal stalen die samen geanalyseerd worden in een 96-well plaat. De bepaling van de ammoniumconcentratie tijdens deze test is gebaseerd op een colorimetrische reactie, de Berthelot reactie (Bucur et al., 2006), waarna de intensiteit van de gevormde kleur bepaald wordt met behulp van een spectrofotometer (Tecan plaatlezer).

Een standaardreeks met concentraties variërend van 2 tot 80 mg N L⁻¹ werd aangemaakt, wat mede het meetbereik van deze methode voorstelde. Daarnaast dienden ook 2 reagentia bereid te worden. Reagens A was zeer basisch en werd samengesteld uit natriumhydroxide (NaOH) en natriumhypochloriet (NaClO). De samenstelling van reagens B was salicylzuur, natriumhydroxide en natriumnitroprussidedihydraat.

Zowel stalen als de standaardreeks, bij voorkeur in drievoud, met elk een eindvolume van 160 µL werden in een 96-wellplaat gebracht. Dit volume werd bereikt door 2 µL staal of standaard aan te lengen met 158 µL MilliQ water. De procedure bestond uit het toevoegen van de 2 reagentia. Eerst werd 45 µL van reagens A toegevoegd om de evenwichtsreactie van ammonium te sturen in de richting van ammoniak. In de tweede stap werd hieronder 35 µL van reagens B gemengd, wat leidde tot de reactie van ammoniak met hypochloriet tot chlooramine. Deze reactie werd gekatalyseerd door natriumnitroprusside wat resulteerde in kleurvorming. De intensiteit van de gevormde gele tot groene kleur werd gemeten bij 690 nm in een Tecan CM infinite F50 en door de resultaten van de stalen te vergelijken met deze van de standaardreeks, kon de ammoniumconcentratie bepaald worden.

2.2 Nitriet

2.2.1 Teststrips

De kwaliteit van het effluent werd kwalitatief gemeten door middel van teststrips (Merck) met een meetbereik van 0.6 en 24 mg N L⁻¹.

2.2.2 Ionenuitwisselingschromatografie (IC)

Nitrietconcentraties in het effluent werden gemeten met een 761 Compact Ion Chromatograaf (Metrohm, Zwitserland) voorzien van een geleidbaarheidsmeter. De kolom was opgebouwd uit quaternaire ammonium groepen zodat anionen gescheiden kunnen worden. Concentratie werd bij dit toestel bepaald door de conductiviteit te meten en deze te vergelijken met de opgestelde calibratiecurve. Concentraties variërend van 0.05 tot 100 mg NO₂⁻ L⁻¹ konden bepaald worden.

2.2.3 High-throughput

De concentratie aan nitriet in stalen kon spectrofotometrisch bepaald worden door de Montgomery reactie (Montgomery & Dymock, 1961). Door gebruik te maken van een 96-wellplaat bij een high throughput test, werd de intensiteit met een Tecan plaatlezer gemeten.

Gelijkaardig aan de methode voor ammonium bepaling in een high-throughput test (sectie 2.1.3, deel 2) moest een standaardreeks aangemaakt worden. De concentraties hierbij hadden een waarde variërend van 0.8 tot 80 mg N L⁻¹. Verder moesten 2 reagentia bereid worden om de Montgomery reactie te bewerkstelligen. Reagens A werd samengesteld uit kaliumwaterstofsulfaat (KHSO₄) en sulfanilzuur en reagens B had slechts 1 bestanddeel: N(1-naphl)ethyleendiaminehydrochloride.

De 96-wellplaat werd gevuld met de standaardreeks, bij voorkeur in drievoud, en de stalen en hadden elk een eindvolume van 200 µL. Dit werd bewerkstelligd door 2 µL van staal of standaard aan te vullen met 198 µL MilliQ water. Achtereenvolgens werd 50 µL van reagens A en B toegevoegd met een incubatieperiode van 5 minuten voor en na de toevoeging van reagens B. De intensiteit van de gevormde roze kleur werd gemeten bij 540 nm in een Tecan CM infinite F50 en de resultaten van de stalen werden vergeleken met deze van de standaardreeks om de concentratie aan nitriet te bepalen.

2.3 Nitraat: Ionenuitwisselingschromatografie (IC)

De concentratie van het nitraat in het effluent kon bepaald worden met behulp van de techniek ionchromatografie. Mede de 761 Compact Ion Chromatograaf (Metrohm, Zwitserland), geciteerd in sectie 2.2.2 (deel 2), werd hiervoor gebruikt. Het meetbereik voor dit anion bedroeg 0.05 tot 100 mg NO₃⁻ L⁻¹.

2.4 Opgeloste zuurstof (DO)

Met behulp van een DO-meter (HACH HQ30d) werd de concentratie aan opgeloste zuurstof in de reactor bepaald. Deze grootte wordt uitgedrukt in mg O₂ L⁻¹.

2.5 Zuurtegraad (pH)

De zuurtegraad van de reactoren werd bepaald met behulp van een digitale pH-meter (Consort C5010) die werkt volgens het potentiometrisch principe. Het toestel werd gekalibreerd met behulp van standaard bufferoplossingen van pH 4 en 7.

2.6 Totale zwevende stoffen (TSS) en vluchtige zwevende stoffen (VSS)

TSS- en VSS-concentraties werden bepaald volgens de standaard methoden 2540D en E (Greenberg et al., 1992). Alvorens metingen uit te voeren, werden millipore glasvezel filters AP40 gedurende 1.5 uur in een moffeloven op 550°C gebracht om negatieve waarden als gevolg van verlies aan vluchtige stoffen wanneer kleine resten verkregen worden, te vermijden. Daarna werden deze bewaard in een dessicator opdat ze geen water zouden opnemen, aangezien dit zou leiden tot stijging van het oorspronkelijk gewicht.

De uiteindelijke procedure voor de bepaling van de VSS- en TSS-concentratie start met het nauwkeurig kwantificeren van het gewicht van een droge filter waarna een gekend volume slib op de filter gebracht werd. Gedurende minstens 1 uur werd de filter in een oven op 105°C geplaatst waarna deze afgekoeld werd in een dessicator tot kamertemperatuur om opnieuw het gewicht te bepalen. Het verschil in het gewicht na deze stap en het oorspronkelijk gewicht was de hoeveelheid TSS in het toegevoegde slib.

Om de hoeveelheid VSS te bepalen werd de filter in een moffeloven op 550°C geplaatst voor 1.5 uur. Deze stap leidde tot de verassing van het aanwezig organisch materiaal. Wederom werd de filter afgekoeld tot kamertemperatuur in een dessicator om opnieuw het gewicht te bepalen. Het verschil in het gewicht voor en na de verassingsstap gaf de hoeveelheid VSS in het toegevoegde slib weer.

2.7 Statistische analyse

Resultaten uit testen en hun bijhorende trends werden statistisch geanalyseerd om conclusies te trekken. In deze thesis werden resultaten uit batchtesten en uit het optimalisatieproces voor biomassabepaling op carriers statistisch geanalyseerd door een t-test uit te voeren. Een belangrijke kanttekening is de veronderstelling van normaal verdeelde data.

Bij elke stap in het optimalisatieproces werden slechts 2 of 3 replica's geanalyseerd, maar door het gelijktijdig inbrengen van alle carriers in de reactor, kan de hypothese van normaal verdeelde biomassaconcentratie op carriers aanvaard worden. Bij batchtesten werd elk scenario in zesvoud getest waardoor ook hier normaliteit aangenomen wordt.

3 Optimalisatie van biomassabepaling op carriers

De biomassabepaling op PVA-carriers werd in deze thesis ontwikkeld door de combinatie van een beschreven biomassabepaling op de PVA-carrier, via eiwitbepaling (Chen et al., 1998) en een reeds geoptimaliseerde methode voor eiwitanalyse van gesuspendeerd slib.

3.1 Extractiesolvent

Het gebruikte solvent voor extractie van eiwitten moet enerzijds zorgen voor een basisch milieu, nodig voor de eiwitanalyse en anderzijds moet het in staat zijn organische verbindingen op te lossen. Daarnaast moet het gebruikte solvent voor extractie ook compatibel zijn met de reagentia van de Lowry-methode. In eiwitanalyse van gesuspendeerd slib wordt gebruik gemaakt van NaOH (1 M), Chen et al. (1998) daarentegen extraheren proteïnen met natriumdodecylsulfaat (SDS; 20%) waardoor beide opties getest werden.

De benodigde hoeveelheid was afhankelijk van de biomassa concentratie op carriers. Bij de uitvoering van de Lowry methode (Lowry et al., 1951) werd telkens een standaardreeks aangemaakt, variërend van 50 tot 250 mg L⁻¹. In optimale opstandigheden bevindt de bekomen concentratie zich tussen deze 2 waarden. Om hogere waarden te bekomen, konden meer carriers geanalyseerd worden. Lagere waarden konden gerealiseerd worden door meer extractiesolvent toe te voegen.

3.2 Aantal segmenten per carrier

PVA-carriers hebben de gunstige eigenschap poreus te zijn waardoor micro-organismen zich in de carriers kunnen vasthechten en groeien en hierbij beschermd worden tegen predatie. Deze karakteristiek heeft een negatief gevolg met betrekking tot extractie van proteïnen aangezien de kern beter beschermd wordt. Om dit te vermijden werden carriers in stukken gesneden zoals ook vermeld werd in Chen et al. (1998). Het effect van deze procedurestap werd nagegaan door de eiwitconcentratie op verschillende carriers te bepalen waarbij enkel het aantal stukken waarin de carrier versneden werd, varieerde van 1 volledige carrier tot 30 stukken.

Het snijden van carriers werd uitgevoerd in de schroefdop van een falcon buis met behulp van een scalpel en een pincet om geen biomassa te verliezen. Nadien werd het extractiesolvent toegevoegd en de falcon tube gesloten. De volledige inhoud werd gemengd met speciale aandacht voor de aanwezigheid van alle stukken carrier in het solvent, om extractie zo efficiënt mogelijk te laten verlopen. De uiteindelijke extractie werd verwezenlijkt door de falcon buis in een warmwaterbad te plaatsen.

3.3 Schudden

Om een optimale extractie te bekomen, moesten stalen met gesuspenseerd slib regelmatig gemixt worden tijdens de extractie. Het effect hiervan werd ook nagegaan bij extractie van eiwitten uit vastgehecht slib.

3.4 Extractietemperatuur

Extractie van gesuspenseerd slib wordt uitgevoerd bij 46 °C. Lagere temperaturen leiden tot onvolledige extractie terwijl hogere temperaturen eiwitten denatureren. Indien stalen regelmatig gemixt worden, worden deze evenveel uit het warmwaterbad gehaald. Om een voldoende hoge temperatuur te verzekeren, werd de temperatuur van het warmwaterbad bij dit protocol ingesteld op 46.5 °C.

3.5 Sonicatie

Sonicatie is een proces waarbij men gebruik maakt van energie, afkomstig van geluidsgolven. Chen et al. (1998) gebruikte deze techniek bij extractie van eiwitten uit PVA-carriers gedurende 2 uur en dit werd ook getest in dit onderzoek. Een sonicatiebehandeling van 15 minuten werd gevolgd door een 2 uur durende extractie in het warmwaterbad. Een noemenswaardig effect van dit proces is het opwarmen van het staal aangezien energie doorgegeven wordt. Voor eiwitextractie is het belangrijk dat de temperatuur niet te hoog wordt zoals vermeld in sectie 3.4 (deel 2).

3.6 Extractieduur

Een optimale extractieduur leidt tot de hoogste concentratie aan eiwitten in het extractiesolvent. Een lange verblijftijd op hoge temperatuur zou kunnen leiden tot degradatie van eiwitten wat vermeden moet worden. Tijdsduur van extractie tijdens deze test varieerde van 1 tot 21 uur.

3.7 Bepaling van eiwitconcentratie

Na het extraheren van proteïnen werd de eiwitconcentratie in het extractiesolvent bepaald met de Lowry methode (Lowry et al., 1951). Deze methode combineert de reactie tussen koperionen en de eindige N van proteïnen onder alkalische opstandigheden en de oxidatie van aromatische aminozuren. Bij de laatstgenoemde reactie wordt het toegevoegde Folin reagens gereduceerd wat resulteert in een blauwe kleur. Een standaardreeks werd aangemaakt met gekende concentraties Bovine Serum Albumine (BSA) om de colorimetrische respons te ijken. Hierbij werd het extractiesolvent gebruikt opdat deze reeks compatibel zou zijn met de stalen. Aangezien zowel NaOH, als SDS getest werden als extractiesolvent, werden ook beide hier getest voor de bepaling van de eiwitconcentratie. De intensiteit van de gevormde blauwe kleur werd gemeten bij 750 nm met behulp van een WPA spectrofotometer.

3.8 Relatie eiwitconcentratie en VSS-concentratie in ABIL

Initieel werd de MBBR gevuld met ABIL-slib en nieuwe carriers. Om biofilmvorming te initiëren, werd deze reactor mede gestuurd zoals een SBR door ook een bezinkingsfase in te voeren en op deze manier geen biomassa te verliezen. Wanneer biofilmvorming optrad, werd deze reactor continu geopereerd om een selectiedruk op te leggen en al het aanwezig gesuspendeerd slib uit te spoelen.

Er wordt verondersteld dat de biomassa een stabiel eiwitgehalte bevat en dat dit gehalte vergelijkbaar is voor gesuspendeerd en vastgehecht slib. Met behulp van de reeds geoptimaliseerde methode voor de extractie en concentratiebepaling van eiwitten uit gesuspendeerd slib en de bepaling van de VSS-concentratie op hetzelfde moment kon deze ratio bepaald worden. Met behulp van deze verhouding en de geëxtraheerde eiwithoeveelheid uit geïnoculeerde carriers kon de VSS-concentratie op 1 carrier bepaald worden, om dit vervolgens te extrapoleren naar de volledige reactor.

3.9 Controletest met optimale protocol

Het optimalisatieproces werd afgesloten met het uitvoeren van een controletest om aan te tonen dat alle eiwitten met deze methode geëxtraheerd werden. Nieuwe carriers werden toegevoegd aan een gekende hoeveelheid slib en gedurende enkele uren geschud zodat alle poriën van de carriers gevuld werden met slib. Vervolgens werden de carriers in stukken gesneden, de overgebleven slibhoeveelheid werd toegevoegd, net als het extractiesolvent. De eiwitextractie werd uitgevoerd door stalen 2 uur in een warmwaterbad op 46.5 °C te plaatsen en op regelmatige basis te schudden. Uiteindelijk werd de eiwitconcentratie in het supernatans met de Lowry methode bepaald. De hoeveelheid proteïnen werd in dezelfde hoeveelheid slib, zonder carriers, bepaald met dezelfde methode en deze 2 resultaten werden vergeleken met elkaar om extractie van proteïnen in poriën te verzekeren.

4 Moleculaire technieken

Doorheen het experiment werden bij mijlpaaltemperaturen stalen genomen en moleculaire analyses uitgevoerd om waarnemingen in de reactoren en batchtesten te verklaren.

4.1 DNA-extractie

Een protocol voor DNA extractie bestaat uit 3 stappen. Er wordt gestart met fysische en chemische lysis van cellen, gevolgd door eliminatie van onzuiverheden om ten slotte DNA te isoleren en verder op te zuiveren. Voor dit onderzoek werd gekozen voor de 'Fast Prep methode' beschreven in Vilchez-Vargas et al. (2013).

4.2 Kwantitatieve polymerasekettingreactie (qPCR)

qPCR werd in deze thesis uitgevoerd volgens het protocol beschreven in (Clippeleir et al., 2012). In de stalen met geëxtraheerd DNA werd het functioneel *amoA* gen van AOB en AOA en het 16S rRNA van *Nitrospira* sp. en *Nitrobacter* sp. gekwantificeerd, door het toepassen van het 'SYBR Green assay (Power SyBr Green, Applied Biosystems)'. De gebruikte primers voor qPCR in dit experiment worden opgesomd in Tabel 6. De gebruikte standaarden waren plasmide DNA die ofwel het functioneel gen *amoA* van AOB of AOA, ofwel het 16S rRNA van *Nitrospira* of *Nitrobacter* dragen.

Tabel 6: Overzicht van de gebruikte primers en condities voor de bepaling van de abundantie van AOB, AOA en NOB met qPCR.

Functionele groep	Doelwit gen	Primers	Sequenties (5'-3')	Smeltemperatuur (°C)	Referentie
AOB	<i>amoA</i> gen	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	54.1	Rotthauwe et al., 1997
		amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	59.2	
AOA	<i>Crenarchaeal amoA</i> gen	CrenamoA23f	ATGGTCTGGCTWAGACG	51.2	Tourna et al., 2008
		CrenamoA616R	GCCATCCATCTGTATGTCCA	54.4	
<i>Nitrospira</i> sp.	16S rRNA gen	NSR1113F	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	56.3	Dionisi et al., 2002
		NSR1264R	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	57.6	
<i>Nitrobacter</i> sp.	16S rRNA gen	Nitro1198F	ACCCCTAGCAAATCTCAAAAACCG	57.8	Graham et al., 2007
		Nitro1423R	CTTCACCCCAGTCGCTGACC	60.4	

DEEL 3: RESULTATEN

1 Optimalisatie van biomassabepaling op carriers

De performantie van afvalwaterreactoren wordt gebruikelijk opgevolgd door middel van volumetrische omzettingssnelheden ($\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$). De specifieke activiteit van de biomassa ($\text{mg N g}^{-1} \text{VSS d}^{-1}$) is echter ook van belang, in het bijzonder wanneer verschillende reactorconfiguraties met elkaar vergeleken worden. In gesuspendeerde systemen is dit eenvoudig te bepalen met behulp van een meting van de vluchtige zwevende stoffen (VSS). Voor biofilmgebaseerde systemen, in deze studie een MBBR, is dit echter een niet voor de hand liggende meting. In deze thesis werd de biomassahoeveelheid op de carriers bepaald via een eiwitmeting en met behulp van het eiwitgehalte van de biomassa. Verschillende parameters zoals extractiesolvent (1.1), het aantal segmenten per carrier (1.2), schudden (1.3), extractietemperatuur (1.4), invloed van sonicatie (1.5) en de extractieduur (1.6) werden eerst geoptimaliseerd om nadien een relatie op te stellen tussen VSS-gehalte en eiwitgehalte (1.8).

1.1 Extractiesolvent

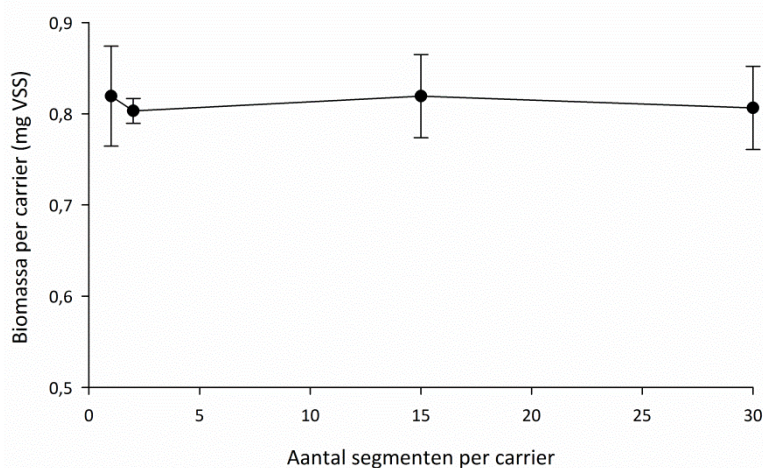
Extractie van eiwitten uit slib werd getest met natriumdodecylsulfaat (SDS; 20 %) en NaOH (1 M). Deze basische oplossingen, die organische verbindingen oplossen, werden gebruikt als extractiesolvent en bij de bereiding van de standaardreeks. Een standaardreeks is nodig voor de uiteindelijke bepaling van de eiwitconcentratie.

Met SDS hadden stalen een gele schijn na het toevoegen van het Folin reagens. Na 40 minuten in een donkere ruimte was deze kleur nog aanwezig, zowel in de standaardreeks als in de stalen. Hierdoor was kwantificatie van proteïnen niet mogelijk. Bij het gebruik van NaOH als extractiesolvent en bij de standaardreeks was een heldere blauwe kleur zichtbaar en werd telkens een R^2 van meer dan 0.98 opgetekend. De blauwe kleur in stalen bewijst ook de aanwezigheid van eiwitten na extractie uit vastgehecht slib met deze base. Voor verdere optimalisatie van deze methode werd altijd NaOH gebruikt als extractiesolvent.

1.2 Aantal segmenten per carrier

Aangezien biomassa in de poriën van deze carriers kan groeien, werd er geopteerd om de carriers in stukken te snijden om de extractie zo optimaal mogelijk te laten verlopen. Het effect van deze fysische verkleining werd in deze stap nagegaan en het resultaat wordt weergegeven in Figuur 8.

Hieruit kan besloten worden dat er geen significante verschillen werden opgemeten tussen de extracties met een verschillend aantal segmenten per carrier ($p < 0.05$) en dat het snijden van carriers geen effect heeft omdat biomassa enkel aan de rand groeit. Verdere operatie van de reactor kan echter leiden tot groei van biomassa in de kern waardoor carriers steeds in stukken gesneden worden.



Figuur 8: Biomassa per carrier (mg VSS) in functie van het aantal segmenten per carrier, berekend uit resultaten van eiwitmetingen.

1.3 Schudden

De extractie van eiwitten uit biomassa op carriers werd uitgevoerd door 7 carriers in stukken te snijden en 2.5 mL NaOH (1 M) toe te voegen. Het gebruik van meerdere carriers was noodzakelijk om bij de bepaling van de eiwitconcentratie de detectielimiet te overschrijden. Om het effect van schudden te bepalen werd enerzijds een staal geschud, door op regelmatige basis op de vortex te plaatsen. Anderzijds werd een staal constant in het warmwaterbad gehouden. De resultaten van de eiwitconcentratie in het extractiemiddel en de daarmee samengaande biomassaconcentratie op 1 carrier worden weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7: Eiwitconcentratie in het extractiemiddel ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en biomassa op 1 carrier (mg VSS) bij een geschud en niet-geschud staal.

	Schudden	Niet schudden
Concentratie proteïnen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	111	106
Biomassa op 1 carrier (mg VSS)	0.372	0.357

Ten gevolge van een significant hogere eiwit- en biomassaconcentratie in het geschud staal ($p < 0.05$), kan geconcludeerd worden dat schudden van stalen de diffusie van het extractiemiddel naar de biomassa op de carrier en in de poriën bevordert. Daarom werden stalen op regelmatige basis geschud bij de extractie van eiwitten.

1.4 Extractietemperatuur

De extractietemperatuur voor extractie van eiwitten uit slib, werd reeds geoptimaliseerd voor gesuspendeerd slib (Vekeman, 2014). Hierbij kon geconcludeerd worden dat hogere temperaturen leiden tot lagere eiwitconcentraties ten gevolge van denaturatie. In het vermelde onderzoek bleek $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ de optimale temperatuur te zijn voor eiwitextractie. Aangezien stalen op regelmatige basis uit het warmwaterbad gehaald worden, fluctueert de temperatuur van deze stalen. Om extractie te verzekeren en te lage temperaturen te vermijden, werd de temperatuur van het warmwaterbad

ingesteld op 46.5 °C. Deze kleine temperatuurstijging had geen significant effect op de kwaliteit van de extractie en de temperatuur bleef voldoende hoog, ook na schudden van deze stalen.

1.5 Sonicatie

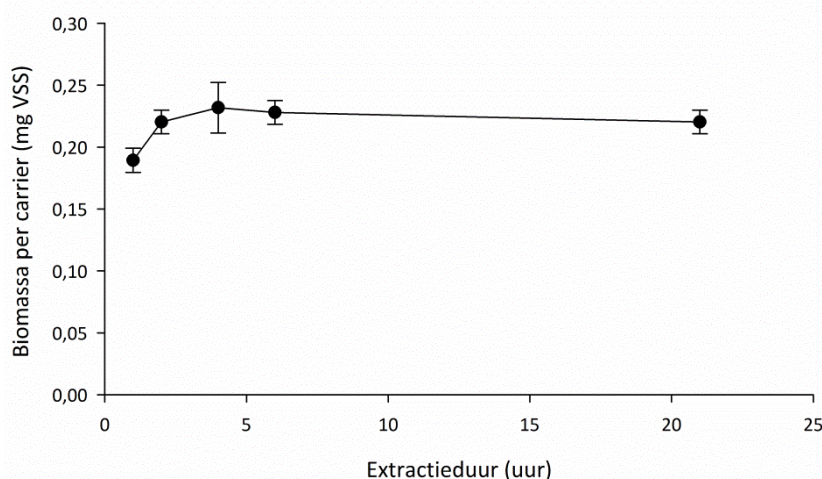
Het effect van sonicatie op extractie van eiwitten, werd getest door enerzijds enkel het normaal protocol te volgen en anderzijds het normaal protocol te laten voorafgaan door 15 minuten sonicatie. De gemeten concentratie aan eiwitten in het extractiemiddel en de daarmee samengaannde biomassaconcentratie, worden weergegeven in Tabel 8. Sonicatie bleek een significant negatief effect te hebben op extractie van eiwitten uit biomassa op PVA-carriers ($p < 0.05$). Na het uitvoeren van deze optimalisatiestap, werd sonicatie verwijderd uit het protocol voor eiwitextractie.

Tabel 8: Gemiddelde eiwitconcentratie in het extractiemiddel ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en biomassa op 1 carrier (mg VSS) bij gesoniceerde en niet-gesoniceerde stalen.

	Sonicatie	Geen sonicatie
Concentratie proteïnen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	116 ± 9	128 ± 8
Biomassa op 1 carrier (mg VSS)	0.75 ± 0.06	0.83 ± 0.05

1.6 Extractieduur

Om de optimale duur van extractie te bepalen, werden verschillende opties getest, variërend van 1 tot 21 uur. Elk staal bevatte 4 carriers in stukken en 2.5 mL NaOH (1M) en elke extractieduur werd in tweevoud uitgevoerd. Uiteindelijk werd van elk staal de concentratie aan eiwitten in het extractiemiddel bepaald, om vervolgens de biomassaconcentratie te bepalen en de hoogste concentratie geeft de optimale extractieduur weer. De bekomen resultaten worden weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9: Biomassa per carrier (mg VSS) in functie van de extractieduur, berekend uit resultaten van eiwitmetingen.

Figuur 9 toont dat de concentratie aan eiwitten eerst stijgt, om vervolgens quasi constant te blijven. Variatie van extractieduur blijkt een significant effect te hebben, aangezien de eiwit- en biomassaconcentratie na 1 uur extractie significant verschilt van deze na 2, 6 en 21 uur ($p < 0.05$). Het staal na 4 uur had een grote afwijking, wat te wijten is aan de variatie aan biomassa op carriers.

Alle stalen met een extractieduur van 2 uur of meer hebben geen significant verschillende resultaten ($p > 0.05$), waardoor geconcludeerd wordt dat een extractieduur van 2 uur voldoende is om alle eiwitten te extraheren en daarom zal deze extractieduur toegepast worden bij dit protocol.

1.7 Bepaling van eiwitconcentratie

De bepaling van de eiwitconcentratie met de Lowry methode, hangt nauw samen met de keuze van het extractiesolvent. Het protocol van de Lowry methode werd gevolgd en het gebruik van SDS (20%) leidde tot de gele schijn van de stalen terwijl NaOH (1M) resulteert in een blauwe kleur waarvan de intensiteit bepaald kan worden. Het laatstgenoemde solvent leidt tot een R^2 die telkens hoger was dan 0.98 voor de gevormde standaardreeks bij de Lowry methode. Zoals reeds vermeld werd in sectie 1.1, deel 3, werd NaOH geselecteerd als extractiesolvent en solvent bij het opstellen van de standaardreeks.

1.8 Relatie eiwitconcentratie en VSS-concentratie in ABIL

Bij de bepaling van de ratio eiwitconcentratie/VSS-concentratie werd verondersteld dat het toenmalig aanwezig gesuspendeerd slib in de reactor dezelfde samenstelling had als het vastgehechte. Meerdere keren werd de eiwitconcentratie in het gesuspendeerd slib bepaald met behulp van de reeds geoptimaliseerde methode. Gelijktijdig werd de VSS-concentratie in de reactor bepaald. Resultaten worden weergegeven in Tabel 9. De gemiddeld ratio 0.31 werd gebruikt om de VSS-concentratie op carriers te berekenen na het bepalen van de eiwitconcentratie.

Tabel 9: Resultaten van bepaling van de VSS-concentratie (g L^{-1}) en de eiwitconcentratie (g L^{-1}) en de daaruit volgende ratio eiwitconcentratie/VSS-concentratie.

VSS (g L^{-1})	Eiwitconcentratie (g L^{-1})				Ratio (-)
	Staal 1	Staal 2	Staal 3	Gemiddeld	
0.79	0.24	0.25	0.20	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.03
0.64	0.22	0.20	0.19	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.03
0.63	0.22	0.21	0.19	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.03
				Gemiddeld:	0.31 ± 0.02

1.9 Controletest

Een controletest moet de werking van het protocol garanderen en zodoende extractie van eiwitten rond en in PVA-carriers verzekeren. Deze test werd 2 keer uitgevoerd en de bekomen concentraties worden weergegeven in Tabel 10. Bij deze resultaten werd nagegaan of het verschil tussen de aanwezigheid van carriers significant is. Met andere woorden er werd gecontroleerd of slib in poriën van carriers mede geëxtraheerd wordt. De bekomen p-waarde is steeds hoger dan 0.05 waardoor geconcludeerd kan worden dat deze resultaten niet significant verschillen. Door de gelijkens met het gestandaardiseerde protocol voor gesuspendeerd slib en de niet significant verschillende resultaten in Tabel 10, kan besloten worden dat dit protocol geschikt is voor bepaling van VSS-concentratie op carriers.

Tabel 10: Eiwitconcentraties ($\mu\text{g mL}^{-1}$), bekomen tijdens de controletest, en bijhorende p-waardes na het uitvoeren van een t-test.

	Slib ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Slib + carriers ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	p-waarde (-)
Test 1	171	151	0.18
	165	162	
	181	144	
Test 2	182	158	0.08
	174	146	
	201	142	

2 Stabilisatie reactoren

Beide reactoren werden geïnoculeerd met ABIL-slib om vervolgens 79 dagen te stabiliseren bij 38 °C. Dit gaf biomassa de mogelijkheid om te acclimatiseren, meer bepaald om een biofilm te vormen op de PVA-carriers in de MBBR. Tijdens deze periode werden verschillende parameters opgevolgd, waarvan de activiteit en biomassaconcentratie, van zowel het gesuspenseerde slib als de biomassa op de carriers, de belangrijkste zijn.

Om figuren op te stellen, werd in deze thesis consequent een verschil gemaakt tussen de SBR en de MBBR enerzijds en tussen ammonium- en nitrietoxiderende organismen anderzijds (Tabel 11). Er werd geen onderscheid gemaakt tussen AOA en AOB, maar hun activiteit wordt gebundeld onder ammoniumoxiderende micro-organismen (AOM).

Tabel 11: Overzicht van gebruikte symbolen in figuren.

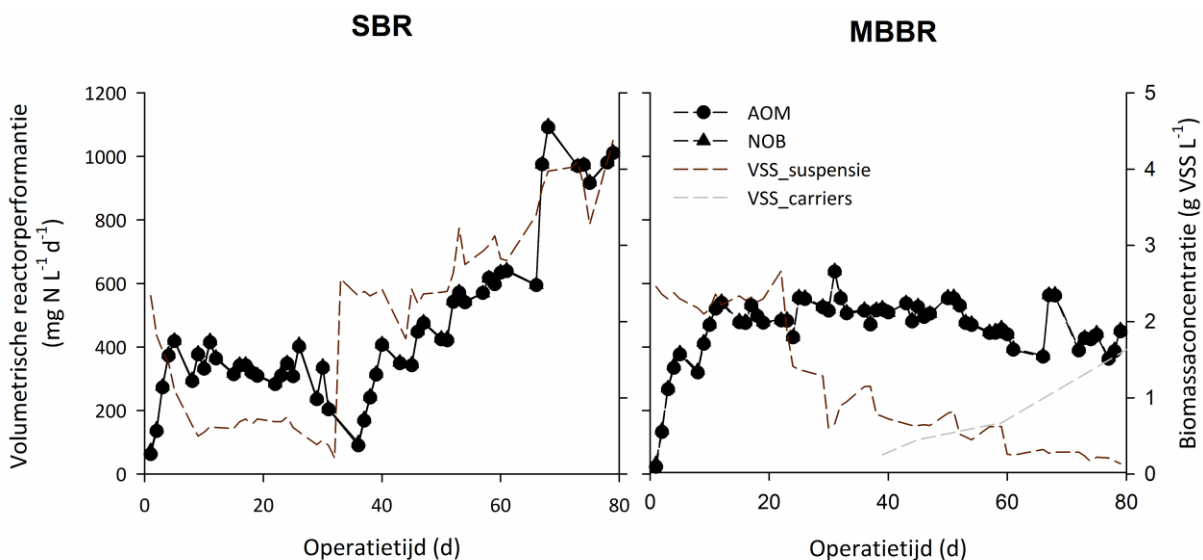
	SBR	MBBR
AOM	—●—	--●--
NOB	—▲—	--▲--

Zowel de SBR als de MBBR bevatten oorspronkelijk gesuspenseerd slib, waarvan de concentratie gemonitord werd. ABIL-slib werd gecultiveerd op CaCO_3 , wat dit slib een melkachtige kleur gaf (Figuur 10, A) en waardoor de VSS/TSS ratio aanvankelijk 14.91 ± 0.32 % was. Tijdens de operatie loste het CaCO_3 op, waardoor een verschuiving naar bruin slib plaatsvond (Figuur 10, B) en het effluent een troebele kleur had. Hiermee samengaan, steeg de verhouding van VSS ten opzichte van TSS tot 100 % in de MBBR en tot 58.53 % in de SBR aan het einde van de stabilisatieperiode. Een bijkomende observatie was een initiële daling in VSS-concentratie net na inoculatie, als gevolg van onmiddellijke uitspoeling.



Figuur 10: Uitzicht van de SBR (telkens links) en MBBR (telkens rechts) aan de start van de stabilisatieperiode (A) en aan het einde van de stabilisatieperiode (B).

Figuur 11 is een weergave van de volumetrische oxidatiesnelheden van NH_4^+ en NO_2^- . Deze stegen merkbaar tijdens de opstart en waren na 10 dagen reeds stabiel voor de MBBR. Hetzelfde fenomeen was merkbaar bij de SBR, maar na 30 dagen was een daling in activiteit waarneembaar, samengaan met een daling in biomassaconcentratie tot $0.21 \text{ g VSS L}^{-1}$. Deze reductie is het gevolg van foute instellingen van de timer van de effluentpomp enerzijds en een pH shock van 9.5 anderzijds. Er werd geopteerd deze reactor opnieuw te inoculeren met 4.7 g VSS en sindsdien was de trend in activiteit continu stijgend. Voor beide reactoren viel de activiteit van de ammonium- en nitrietoxiderende organismen steeds samen, wat verklaard kan worden door een hogere potentiële activiteit van de nitrietoxiderende organismen.



Figuur 11: Volumetrische nitrificatiesnelheden en biomassaconcentratie (gesuspenseerd en op carriers) in de SBR (links) en in de MBBR (rechts) tijdens de stabilisatieperiode bij $38 \text{ }^\circ\text{C}$.

Gedurende de stabilisatieperiode werden op regelmatige tijdstippen batchtesten uitgevoerd om trends in activiteiten waar te nemen. De maximale oxidatiesnelheid van zowel gesuspenseerd slib uit beide reactoren als van de biofilm op carriers uit de MBBR werd bepaald (Tabel 12). Hieruit bleek dat de activiteit van NOB hoger was dan deze van AOM. Dit verklaart de samenloop van de 2 curven in Figuur 11 en toont aan dat nitrietaccumulatie niet zou optreden. De specifieke activiteit van de micro-organismen was doorheen de stabilisatieperiode niet constant en omgekeerd gecorreleerd

met de biomassaconcentratie, aangezien de micro-organismen niet maximaal gevoed werden. Aanvankelijk was geen biofilm aanwezig op de carriers, waardoor NH_4^+ en NO_2^- niet geoxideerd werden in batchtesten, maar na 4 weken werd geringe activiteit opgemeten. De oxidatiesnelheden van de NOB waren ook in dit scenario significant groter, maar een globale stijgende trend in ammoniumoxidatie op de carriers was merkbaar. Op dag 39 kon voor de eerste maal de biomassaconcentratie op de carriers bepaald worden. Deze bedroeg $0.027 \text{ mg VSS carrier}^{-1}$ wat overeenstemt met $0.255 \text{ g VSS L}^{-1}$ in de reactor. Bij voldoende opgemeten activiteit en biomassa op de carriers werd beslist de MBBR gedurende 1 cyclus per dag continu te opereren en zodoende gesuspendeerd slib te verwijderen uit de reactor (dag 72). Na een stabilisatieperiode van 79 dagen werd de bezinkingfase in de MBBR definitief geëlimineerd.

Tabel 12: Maximale oxidatiesnelheden van gesuspendeerd slib uit beide reactoren en van biofilm, bepaald tijdens batchtesten.

Dag	SBR		MBBR: suspensie		MBBR: carriers	
	AOM ($\text{mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$)	NOB ($\text{mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$)	AOM ($\text{mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$)	NOB ($\text{mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$)	AOM ($\text{mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$)	NOB ($\text{mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$)
3	268 ± 10	331 ± 50	324 ± 31	368 ± 34	-	-
10	734 ± 90	1194 ± 223	231 ± 20	503 ± 93	-	-
17	217 ± 24	1533 ± 565	239 ± 39	719 ± 127	-	-
24	410 ± 120	1275 ± 142	383 ± 19	1154 ± 74	-	-
45	315 ± 21	417 ± 35	741 ± 80	2354 ± 87	33 ± 8	1173 ± 192
52	129 ± 8	560 ± 48	764 ± 46	1840 ± 140	39 ± 2	497 ± 66
66	142 ± 19	681 ± 104	821 ± 98	1173 ± 129	37 ± 1	546 ± 42
79	118 ± 3	525 ± 100	-	-	55 ± 2	265 ± 28

- : geen gemeten snelheden

ABIL was het inoculum van beide reactoren en bevatte zowel bacteriën als archaea om nitrificatie uit te voeren. Tijdens de stabilisatie werden gelijke trends waargenomen in beide reactoren (Tabel 13). De abundantie van AOA en *Nitrobacter* daalde, maar sterker in de MBBR en het aantal *amoA* kopies van AOB steeg opmerkelijk tot vergelijkbare waarden in beide reactoren (grootteorde 10^{11}). De stijging van *Nitrospira* was duidelijker in de SBR dan in de MBBR.

Tabel 13: Abundantie van verschillende genera aan de start (1), tijdens (2) en aan het einde (3) van de stabilisatieperiode in de SBR en in de biofilm van de MBBR.

	<i>amoA</i> AOB (kopies $\text{g}^{-1} \text{ VSS}$)	<i>amoA</i> AOA (kopies $\text{g}^{-1} \text{ VSS}$)	Ratio: AOB/AOA	<i>Nitrobacter</i> (kopies $\text{g}^{-1} \text{ VSS}$)	<i>Nitrospira</i> (kopies $\text{g}^{-1} \text{ VSS}$)	Ratio: <i>Nitrobacter</i> / <i>Nitrospira</i>
SBR: 1	2.09×10^9	3.48×10^8	6	4.75×10^{10}	6.74×10^9	7.046
2	6.47×10^{10}	2.32×10^8	279	1.03×10^9	4.28×10^{10}	0.024
3	3.92×10^{10}	6.17×10^7	635	6.95×10^8	2.46×10^{10}	0.028
MBBR: 1	2.09×10^9	3.48×10^8	6	4.75×10^{10}	6.74×10^9	7.046
2	3.64×10^{10}	5.14×10^6	7091	2.88×10^8	1.49×10^{10}	0.019
3	8.04×10^{10}	4.06×10^6	19789	9.07×10^7	1.79×10^{10}	0.005

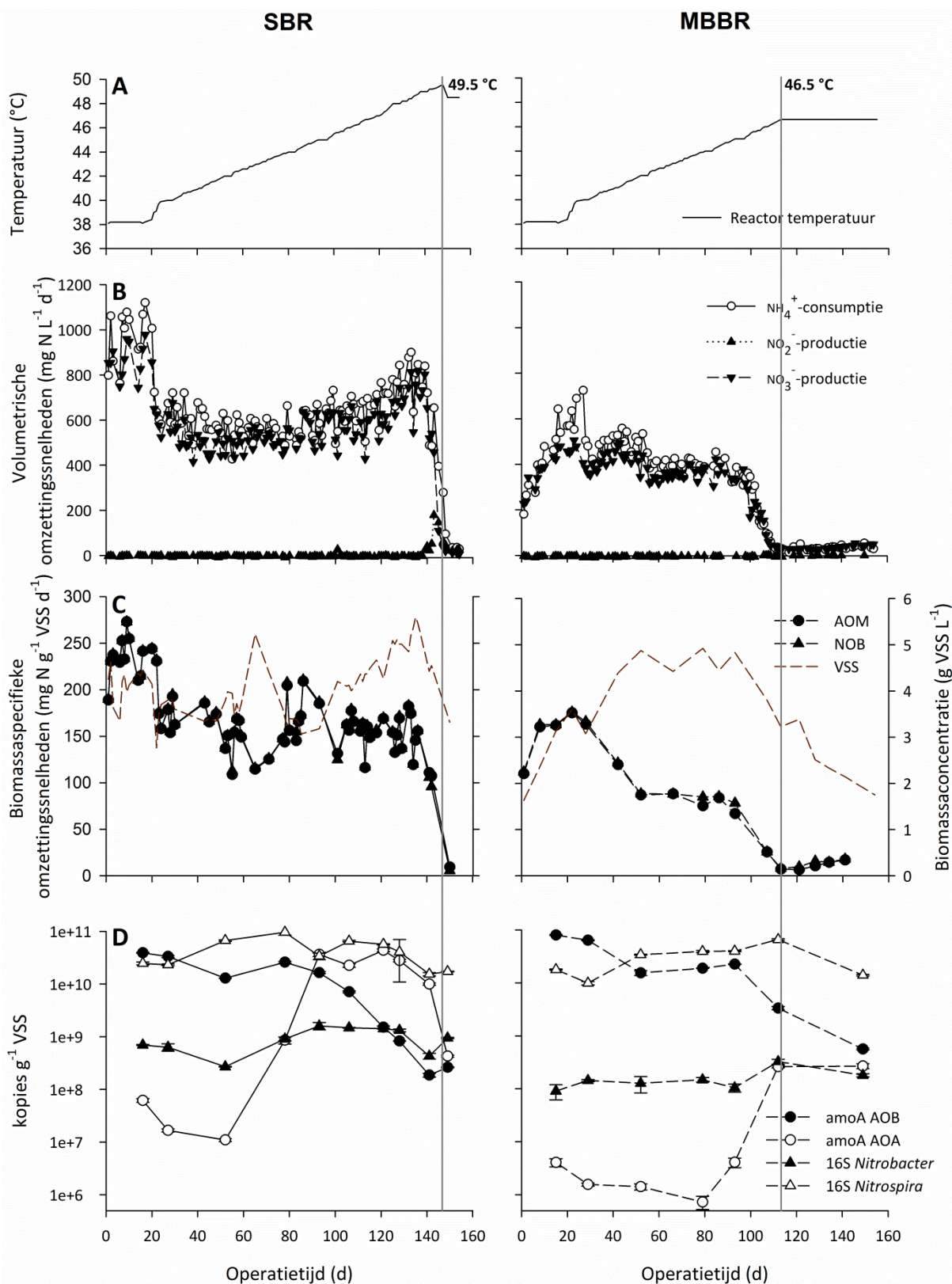
3 Temperatuuropdrijving reactoren

3.1 Reactorperformantie

Tijdens het experiment werd, in een gestabiliseerde SBR en MBBR, gestart op 38 °C. Daarna werd de temperatuur geleidelijk opgedreven om zodoende de biomassa te laten adapteren aan hogere temperaturen of om selectie door te voeren op de heersende gemeenschap. Een identieke strategie werd toegepast in beide reactoren, zoals weergegeven in Figuur 7. De eigenlijke reactortemperaturen worden weergegeven in Figuur 12, A.

In de **SBR** werden zeer hoge volumetrische nitrificatiesnelheden waargenomen (Figuur 12, B, links). Tijdens de eerste 20 dagen van het experiment werd minstens 800 mg N L⁻¹ d⁻¹ genitriciseerd, waarna een derde van het slib gespuid werd, om de biomassaconcentratie te controleren. Simultaan werd de influentconcentratie van het synthetisch afvalwater gereduceerd tot 600 mg N L⁻¹ d⁻¹. Vervolgens werden de ammonium- en nitrietoxidatie stabiel gehouden bij 575 ± 59 mg N L⁻¹ d⁻¹ tot een temperatuur van 44.3 °C. Na het uitvoeren van een cyclusopvolging werd ontdekt dat de toegediende stikstof bijna instantaan genitriciseerd werd, waardoor geopteerd werd om influentconcentratie geleidelijk te verhogen. Er werden opnieuw volumetrische nitrificatiesnelheden opgetekend van 776 ± 62 mg N L⁻¹ d⁻¹ bij een temperatuur van 49 °C (Figuur 12, B). Bij deze temperatuur is een splitsing van ammoniumverwijdering en nitraatproductie waarneembaar, aangezien nitratatie stil viel. Er werd geëvolueerd naar een systeem met partiële nitrificatie. De gevoeligheid van AOM voor nitrietconcentraties tot 500 mg N L⁻¹ werd getest in een batchtest, hoewel de maximale blootgestelde concentratie slecht 200 mg N L⁻¹ was. De inhibitie was niet significant ($p > 0.05$) waardoor de influentconcentratie constant gehouden werden. Door een technisch defect aan de pH controller, resulterend in een verzuring van de reactor, was de activiteit van de ammoniumoxiderende organismen toch tot een minimum gezakt bij 49.5 °C, waarna beslist werd de temperatuur met 1 graad te verminderen om volledige nitrificatie te herstellen.

Wanneer de biomassaconcentratie in de reactor in rekening gebracht wordt, wordt de specifieke activiteit van de micro-organismen verkregen (Figuur 12, C). Tijdens het experiment bleek de activiteit negatief gecorreleerd te zijn met de biomassaconcentratie, aangezien micro-organismen niet maximaal gevoed werden. Dit fenomeen is duidelijk waar te nemen tussen dag 64 en 80. Dag 64 heeft een hoge biomassaconcentratie van 5.2 g VSS L⁻¹ en een specifieke activiteit van 116 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹. Vervolgens werd slib uit deze reactor gespuid, hetgeen resulteerde in een stijging tot 208 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹, wat dichterbij hun maximale activiteit gelegen is. Met uitzondering van de eerste 20 dagen, is een globaal gemiddelde specifieke activiteit bij 155 ± 24 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ zichtbaar. De laatste daling in biomassaconcentratie is het gevolg van een technisch probleem waardoor biomassa afstierf en uitspoelde.



Figuur 12: Performantie van de SBR (links) en de MBBR (rechts) in functie van de operatietijd. A: Temperatuurprofiel. B: Volumetrische reactorperformantie. C: Specifieke nitrificatiesnelheid en biomassaconcentratie. D: Aantal gedetecteerde kopies van nitrificatiespecifieke genen.

Aan de start van het experiment was nog veel gesuspendeerd slib aanwezig in de **MBBR**, maar door de continue operatie ervan spoelde dit snel uit. De influentconcentratie in deze reactor werd preventief verlaagd in vergelijking met het einde van de stabilisatieperiode, maar deze werd al snel opgedreven naar het maximale niveau van $580 \pm 44 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Ten gevolge van een verzuring, door het falen van de pH controller, daalde de volumetrische activiteit met 30 % bij het bereiken van $40 \text{ }^\circ\text{C}$, maar deze reactor herstelde goed. Vanaf dag 30 werd stabiele nitrificatie bewerkstelligd van $358 \pm 44 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ tot $45.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (dag 100), waarna een drastische daling in activiteit waargenomen werd tot $23 \pm 8 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bij $46.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Aangezien meer dan 90 % van de activiteit verloren was, werd beslist de temperatuurstijging stop te zetten. In de MBBR zijn ammoniumverwijdering en nitraatproductie hoofdzakelijk evenwaardig en nitrietaccumulatie afwezig. Herstel van activiteit bij $46.5 \text{ }^\circ\text{C}$ is beperkt, maar een geringe stijging in volumetrische reactorperformantie was waar te nemen.

Een duidelijke trend in biomassaconcentratie is waar te nemen in de MBBR. Aanvankelijk was de biomassaconcentratie op carriers laag, maar door selectieve druk, als gevolg van continue operatie, was een snelle groei merkbaar. De biomassaconcentratie stabiliseerde rond 5 g VSS L^{-1} waarna deze opnieuw daalde door afsterving vanaf $45.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Evaluatie van specifieke activiteiten geeft aan dat deze aanvankelijk hoog waren, maar ze daalden door biomassagroei en gelijke influentconcentraties vanaf dag 28. Vervolgens werden opnieuw stabiele resultaten bekomen bij $87 \pm 18 \text{ mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$. Bij de daling in biomassaconcentratie vanaf $45.5 \text{ }^\circ\text{C}$, daalde ook de specifieke activiteit waardoor geconcludeerd kan worden dat biomassa effectief afstierf.

3.2 Microbiële gemeenschapsanalyse

De abundantie van verschillende genera werd doorheen het experiment bepaald via qPCR. Figuur 12 (D) toont het aantal gedetecteerde kopies van enerzijds het functioneel gen *amoA* van AOA en AOB en anderzijds van het 16S rRNA gen van *Nitrospira* en *Nitrobacter*.

Bij de start van het experiment was het gehalte aan bacterieel *amoA* in de SBR 635 ± 55 keer hoger dan het archaeaal *amoA*, maar een shift vond plaats. Vanaf $42 \text{ }^\circ\text{C}$ steeg het aantal archaeaal *amoA* en na het bereiken van $44 \text{ }^\circ\text{C}$, daalde de hoeveelheid bacterieel *amoA*. Bij $45 \text{ }^\circ\text{C}$ waren archaea de dominante ammoniumoxideerders en dit wijzigde niet meer tijdens deze studie. Simultaan met de daling in ammoniumoxidatie tussen 49 en $49.5 \text{ }^\circ\text{C}$, werd een daling aan archaeaal *amoA* gedetecteerd. *Nitrospira* bleek het dominante genus voor nitrietoxidatie. Doorheen het experiment was de abundantie van deze organismen 10 tot 100 keer groter dan deze van de *Nitrobacter*.

De **MBBR** werd mede geïnoculeerd met ABIL, maar voor het experiment werd de gemeenschap samengesteld uit vastgehechte organismen. Aanvankelijk werden zowel *amoA* van bacteriën als archaea gedetecteerd. Het aantal bacteriële *amoA* genen was initieel vergelijkbaar met de SBR (grootteorde 10^{11}), maar de biofilm bevatte opvallend minder AOA (6.17×10^7 kopies g^{-1} VSS versus 4.06×10^6 kopies g^{-1} VSS voor respectievelijk de SBR en MBBR). Deze 2 observaties geven aanleiding tot een grotere AOB/AOA ratio in de MBBR in vergelijking met de SBR. Tijdens de operatie daalde tot $44 \text{ }^\circ\text{C}$ het aantal *amoA* van zowel bacteriën als archaea in de MBBR licht, waarna het aandeel archaeaal *amoA* significant steeg tot een stabiele waarde bij $46.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Gelijkaardig aan de SBR, gaat een stijging in AOA gepaard met een daling in AOB, welke zelfs na de crash nog doorgaat. De stijging was echter pas op te merken vanaf $44 \text{ }^\circ\text{C}$, in tegenstelling tot $42 \text{ }^\circ\text{C}$ in de SBR. Ondanks deze

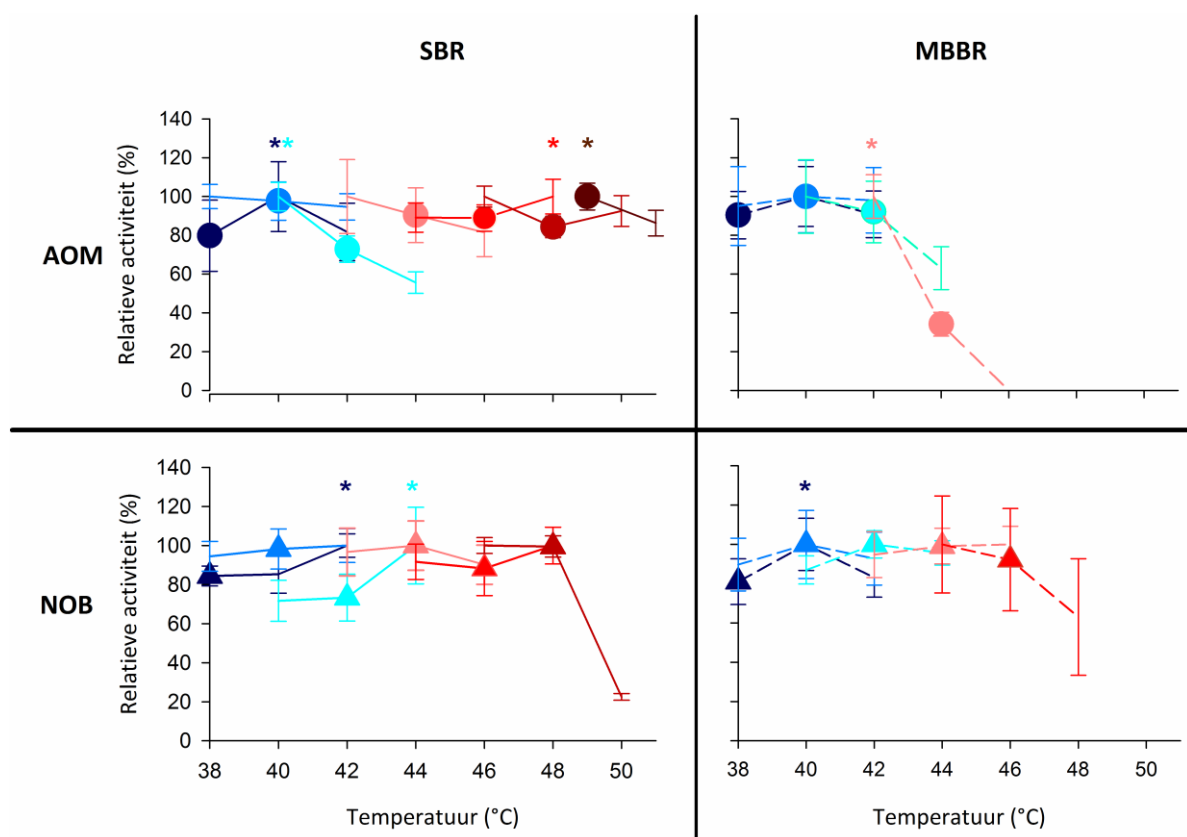
ontwikkeling, is de stabiele waarde van AOA bij 46.5 °C nog steeds een factor 100 lager dan in de SBR bij deze temperatuur. De abundantie van het 16S gen van *Nitrospira* was, identiek aan de SBR, significant hoger dan het 16S gen van *Nitrobacter* gedurende het ganse experiment.

3.3 Temperatuuradaptatie

Tijdens de temperatuuropdrijving werden batchtesten uitgevoerd met slib uit de reactoren. Hierbij werd de activiteit bepaald op verschillende temperaturen, normaliter de reactortemperatuur ± 2 °C. Op deze strategie werd één uitzondering gemaakt, namelijk bij het eerste datapunt op 38 °C. Er was geen interesse in wat gebeurde op een lagere temperatuur, waardoor getest werd op 38, 40 en 42 °C. Figuur 13 is een relatieve weergave van de bekomen resultaten, waarbij de hoogste activiteit per batchtest gelijkgesteld werd aan 100 % en benoemd werd als optimale temperatuur. Deze weergave laat toe de adaptatiecapaciteit op te volgen en een voorspelling te maken voor het verdere verloop van het experiment. Elke curve komt overeen met een temperatuur in de reactor, waaraan slib geadapteerd was en dit wordt aangegeven door het symbool in de curve. Als het symbool overeen komt met een activiteit van 100 %, wordt de hoogste activiteit gemeten bij de reactortemperatuur, maar de verschillen zijn soms niet significant.

De activiteit van AOM in de **SBR** was continu hoog en het procentueel verschil in 1 batchtest was bijna constant kleiner dan 20 % (Figuur 13). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de temperatuurstijging voor deze organismen geen probleem veroorzaakte. Bij de eerste batchtest, met reactortemperatuur van 38 °C, bleek 40 °C de optimale temperatuur te zijn voor het slib. Gedurende de volgende 3 testen leek dit optimum niet te wijzigen, maar de batchtest met reactortemperatuur van 46 °C gaf de grootste activiteit bij 48 °C wat een vermoeden geeft voor verschuiving in gemeenschap. In de laatst uitgevoerde batchtest was slib geadapteerd aan 49 °C en werd de activiteit bepaald op 49 en 51 °C. De activiteit op 49 °C was significant hoger van deze bij 51 °C, maar er kan niet geconcludeerd worden dat AOM in de SBR zullen falen bij 51 °C.

De nitrietoxiderende organismen vertoonden in absolute waarde bijna altijd hogere activiteit dan de ammoniumoxiderende organismen. De relatieve resultaten op verschillende temperaturen geven aan dat de optimale temperatuur gedurende het hele experiment hoger dan of gelijk is aan de reactortemperatuur. Maar bij de laatste batchtest, bij een reactortemperatuur van 48 °C, daalde de activiteit significant op 50 °C en in absolute waarde was dit evenwaardig aan de activiteit van de AOM in deze reactor. Met deze resultaten kon voorspeld worden dat deze organismen een temperatuurstijging moeilijker zullen overleven. Dit werd bevestigd in de reactor aangezien er vanaf 49 °C nitrietaccumulatie optrad (Figuur 13).



Figuur 13: Temperatuur-activiteitscurves van SBR en MBBR voor zowel AOM als NOB. Batchtesten werden uitgevoerd op reactortemperatuur, aangegeven door het symbool, 2 graden kouder en 2 graden warmer. Een uitzondering hierop is de eerste curve bij reactortemperatuur 38 °C waar getest werd op 38, 40 en 42 °C omdat er geen interesse is voor de activiteit bij 36 °C. De resultaten zijn een relatieve weergave waarbij de hoogste activiteit per curve gelijkgesteld wordt aan 100 %. Significante optima worden aangeduid met een asterisk ($p < 0.05$).

In de **MBBR** werden reeds vroeger problemen met oxidatie van NH_4^+ waargenomen waardoor minder batchtesten gerapporteerd worden voor deze reactor. Gelijke trends zijn waarneembaar in de SBR en de MBBR voor AOM in de eerst helft van het experiment. De optimale temperatuur blijkt 40 °C te zijn, maar deze is niet gewijzigd voor de MBBR. Bij de batchtest op een reactortemperatuur van 44 °C, is de activiteit op 44 °C reeds significant verschillend van deze op 42 °C en op 46 °C werd geen activiteit gedetecteerd (Figuur 13). Deze voorspelling uit de batchtesten werd bevestigd in de reactor. Bij 46 °C in de reactor werd opnieuw een batchtest uitgevoerd, aangezien nog activiteit waargenomen kon worden, maar voor de AOM was deze niet te detecteren op 44, 46 en 48 °C in de batchtest.

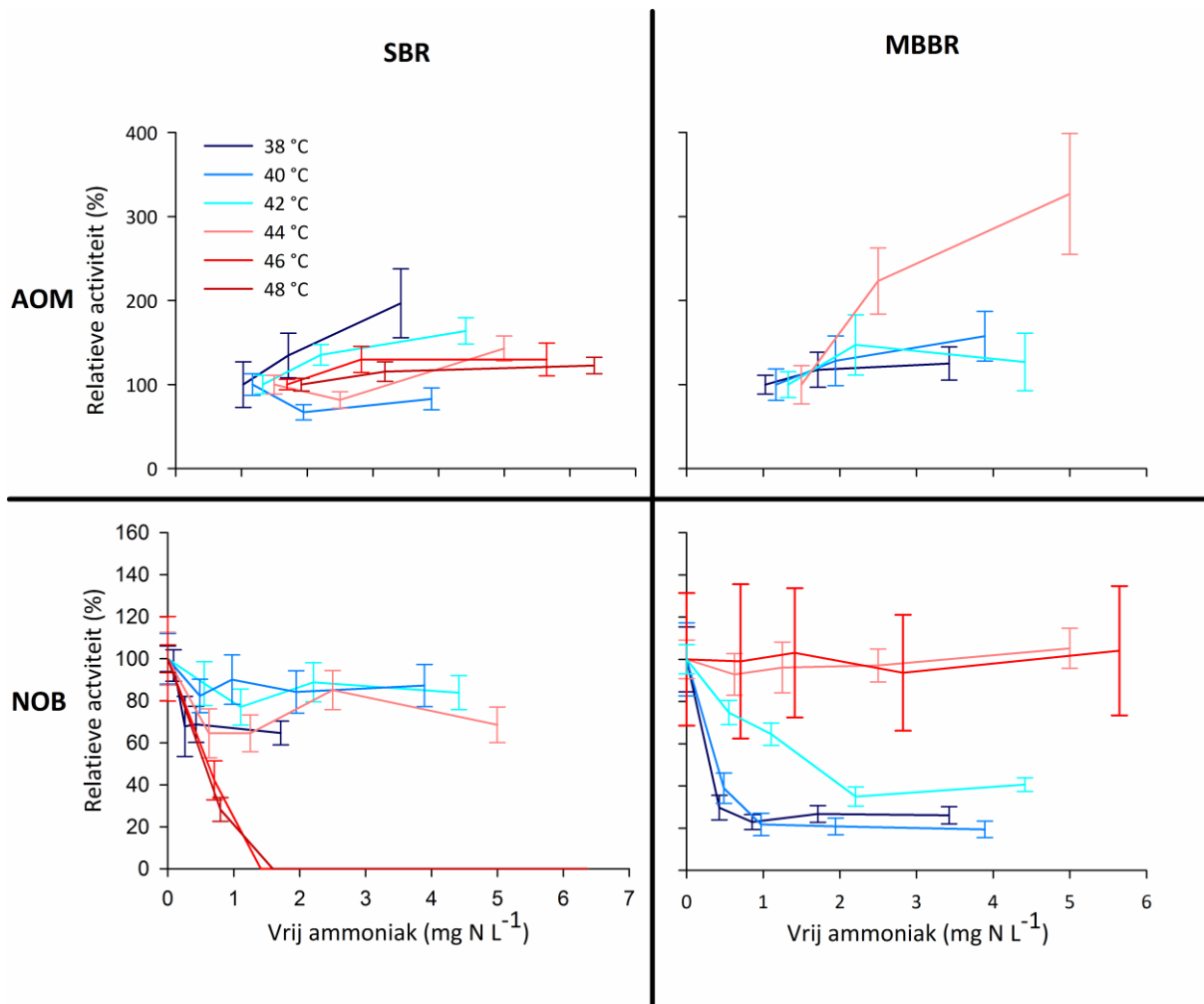
De activiteit van de NOB in de MBBR was, met uitzondering van de test op een reactortemperatuur van 46 °C, altijd hoger dan $300 \text{ mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$. De optimale temperatuur was voor de eerste 2 batchtesten 40 °C maar dit optimum wijzigde positief met het stijgen van de temperatuur in de reactoren. De laatste batchtest, bij reactortemperatuur van 46 °C, toonde een dalende trend met stijgende temperatuur. Dit gaf aan dat de activiteit zou dalen als de temperatuur steeg in de reactor. Absoluut was de hoogste activiteit in de laatste batchtest $48 \text{ mg N g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$, wat laag is in vergelijking met de overige resultaten in dit onderdeel. Aangezien de activiteit van AOM niet gedetecteerd werd in de gelijklopende testen, werden geen problemen zoals nitrietaccumulatie verwacht in de reactor.

3.4 Gevoeligheid voor vrij ammoniak

Op verschillende temperaturen werd de gevoeligheid voor vrij ammoniak van AOM en NOB, uit zowel de SBR als de MBBR, getest. Totale ammoniakale stikstofconcentraties, variërend van 60 tot 200 mg N L⁻¹ voor AOM en van 0 tot 200 mg N L⁻¹ voor NOB, worden met kennis van pH en temperatuur omgezet naar vrij-ammoniakconcentraties. Aangezien de temperatuurstijging in de MBBR gestopt werd bij 46.5 °C, zijn het aantal curven voor deze reactor minder talrijk dan de SBR. Om trends te achterhalen, werden de resultaten relatief weergegeven ten opzichte van de controle met de laagste vrij-ammoniakconcentratie (Figuur 14). De resultaten van deze testen werden gebruikt bij de operatie van reactoren (N-belasting) om nitrietaccumulatie te vermijden.

Aan de start van het experiment werden AOM in de **SBR** gestimuleerd bij hogere vrij-ammoniakconcentraties, maar naarmate de temperatuur steeg, werd deze stimulatie afgeremd. Een stijgende inhibitie kon tevens waargenomen worden bij de NOB in deze reactor naargelang de temperatuur steeg. Deze organismen werden altijd geïnhibeerd door vrij ammoniak, zelfs bij lage concentraties, maar absolute activiteiten van NOB bleven tot 44 °C bij alle geteste concentraties hoger dan deze van de AOM, waardoor nitrietaccumulatie niet zou voorvallen. Vanaf 46 °C resulteerde de aanwezigheid van vrij-ammoniakconcentraties van 1.41 mg N L⁻¹ en meer tot inactieve NOB, maar bij lage concentraties was de waargenomen activiteit nog steeds hoger dan deze van de AOM. Uit de laatste 2 batchtesten kan een IC₅₀ voor NOB bepaald worden en deze bedraagt 0.67 ± 0.01 mg N L⁻¹.

Vastgehechte AOM, in de **MBBR**, werden aanvankelijk licht gestimuleerd met een stijgende vrij-ammoniakconcentratie, maar door stijging van de temperatuur wordt de stimulatie versterkt. Bij de NOB in de MBBR is mede een positieve trend waarneembaar, aangezien inhibitie kleiner werd naarmate de temperatuur opgedreven werd. Aanvankelijk bedroeg de IC₅₀ 0.48 ± 0.07 mg N L⁻¹, maar deze was niet meer te berekenen vanaf 44 °C aangezien geen significante inhibitie opgemeten werd. In de MBBR wordt geen curve van AOM op 46 °C weergegeven omdat deze activiteiten niet gedetecteerd werden in de batchtest, in tegenstelling tot de NOB bij deze temperatuur. Alhoewel de absolute activiteit van NOB op 46 °C slechts 44 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ bedroeg, werd de trend bevestigd. Er kan geconcludeerd worden dat vrij-ammoniakconcentraties van 5 en 5.65 mg N L⁻¹ respectievelijk AOM bij 46 °C en NOB bij 48 °C niet inhiberen.

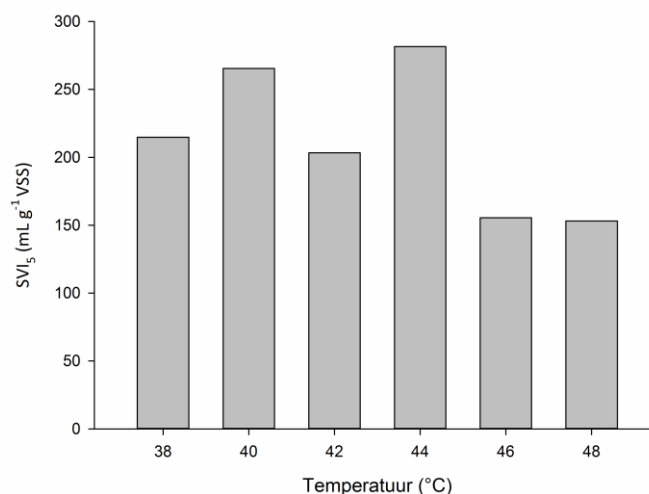


Figuur 14: Relatieve activiteit in functie van vrij ammoniak (mg N L⁻¹) van AOM en NOB uit de SBR en de MBBR. Verschillende curven stellen de temperatuur voor waaraan slib geadapteerd werd in de reactoren. De activiteiten worden relatief voorgesteld ten opzichte van de activiteit opgemeten bij de laagste vrij-ammoniakconcentratie.

3.5 Slibkarakteristieken

3.5.1 Slibvolume-index (SVI₅) en slibretentietijd (SRT)

De SVI is een karakteristiek van de bezinking van biomassa (lage SVI = goede bezinking) en werd bepaald bij elke mijlpaaltemperatuur (Figuur 15). Aanvankelijk bedroeg de SVI₅ 215 mL g⁻¹ VSS. Tot en met 44 °C was deze parameter stabiel bij 241 ± 38 mL g⁻¹ VSS. Nadien werd een vooruitgang geobserveerd en daalde de SVI₅ tot 154 ± 2 mL g⁻¹ VSS bij 46 en 48 °C.

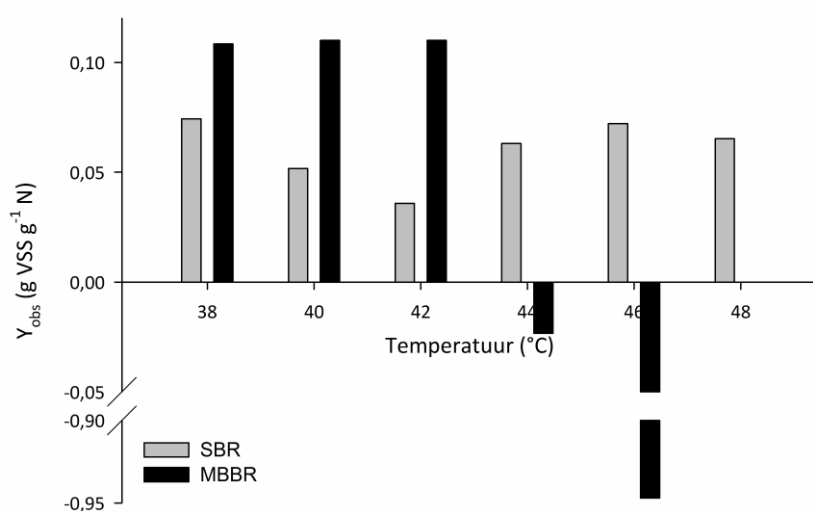


Figuur 15: Slivolume-index na 5 minuten van slib uit de SBR bij elke mijlpaaltemperatuur.

Gedurende de operatie werd de slib retentietijd (SRT) voor de MBBR verondersteld oneindig te zijn, in de SBR werd deze parameter berekend per mijlpaaltemperatuur en deze bedroeg gemiddeld 81 ± 25 d gedurende het experiment.

3.5.2 Slibproductie (Y_{obs})

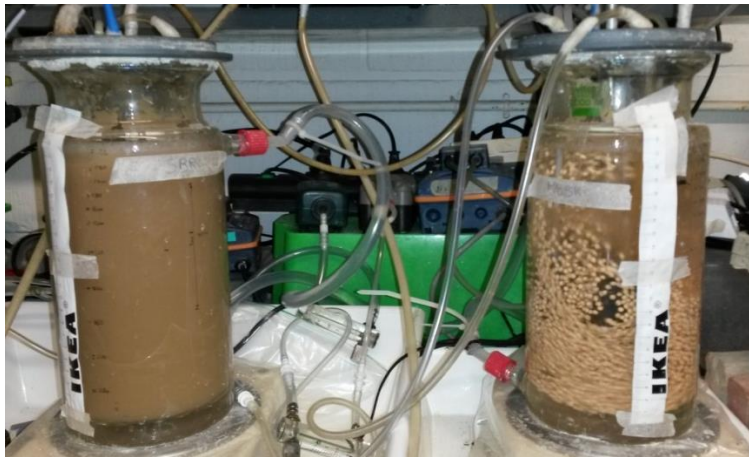
De slibproductie werd bepaald bij elke mijlpaaltemperatuur in beide reactoren (Figuur 16). Gedurende de eerste 7 weken steeg de biomassaconcentratie in de MBBR van $1.63 \text{ g VSS L}^{-1}$ naar $4.88 \text{ g VSS L}^{-1}$, overeenstemmend met een stabiele slibproductie van $0.11 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$. Na het bereiken van 42 °C daalde de slibproductie en werd uiteindelijk negatief ten gevolge van afsterving van biomassa bij 46 °C (Figuur 12, C). Bij het herstel van activiteit werd een positieve slibproductie van $0.04 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ waargenomen. In de SBR bedroeg de Y_{obs} aanvankelijk $0.074 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$, maar ten gevolge van temperatuurstijging daalde deze tot $0.036 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ bij 42 °C . Nadien steeg deze opnieuw tot de stabiele waarde $0.067 \pm 0.005 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ bij 44 tot 48 °C .



Figuur 16: De waargenomen slibproductie ($\text{g VSS g}^{-1} \text{ N}$) van de SBR en de MBBR bij elke mijlpaaltemperatuur.

3.5.3 Morfologie

Het eerst besproken kenmerk is de kleur van het slib. Zoals reeds vermeld in sectie 2 (deel 3) werd de reactor geïnoculeerd met ABIL dat oorspronkelijk een melkachtige kleur had, wat na de stabilisatieperiode geëvolueerd was naar een bruine kleur. In het eerste deel van het experiment bleef het slib deze bruine kleur vertonen, zoals weergegeven in Figuur 17. Deze foto werd genomen toen de reactortemperatuur 39.7 °C bedroeg. Bij een verdere temperatuurstijging ontwikkelde zich een bruin-groene kleur in de SBR (Figuur 18, links). De kleur van de MBBR was ook veranderd, maar was het gevolg van afsterving van biomassa (Figuur 18, rechts). De foto toont de reactoren bij een reactortemperatuur van 48.4 °C in de SBR en 46.5 °C in de MBBR na een herstelperiode van 20 dagen.



Figuur 17: Uitzicht van reactoren (SBR links en MBBR rechts) op dag 18 van het experiment (reactortemperatuur = 39.7 °C).



Figuur 18: Uitzicht van reactoren op dag 133 van het experiment (reactortemperatuur = 48.4 °C in de SBR, links; reactortemperatuur = 46.5 °C in de MBBR na een herstelperiode van 20 dagen, rechts).

Het tweede morfologisch kenmerk is het uitzicht van het slib tijdens de bezinkingsfase in de SBR en dit wordt gelinkt aan de SVI_5 . Op dag 1 van het experiment is een goede bezinkbaarheid waar te nemen (Figuur 19). Naarmate het experiment vorderde, vond vlokvorming plaats, wat duidelijk te merken is tijdens de bezinkingsfase. Figuur 20 geeft deze vlokvorming weer op dag 78 van het experiment. Vanaf een reactortemperatuur van 46 °C werd een lagere SVI opgetekend, in vergelijking met het eerste deel van het experiment, wat resulteert in een beter bezinking en minder vlokvorming (Figuur 21).



Figuur 19: Uitzicht van de SBR in de bezinkingsfase op dag 1 van het experiment (reactortemperatuur = 38 °C).



Figuur 20: Uitzicht van de SBR in de bezinkingsfase op dag 78 van het experiment (reactortemperatuur = 44 °C).



Figuur 21: Uitzicht van de SBR in de bezinkingsfase op dag 107 van het experiment (reactortemperatuur = 46 °C).

Figuur 22 toont enkele ongebruikte en enkele geïnoculeerde carriers aan het einde van het experiment. Ondanks de afsterving na het bereiken van 45.5 °C, is de biofilm nog steeds duidelijk zichtbaar.



Figuur 22: Ongebruikte carriers (links) en geïnoculeerde carriers op dag 164 van het experiment (rechts).

DEEL 4: DISCUSSIE

1 Optimalisatie van biomassabepaling op carriers

Een doelstelling in deze thesis was het vergelijken van een gesuspendeerd met een biofilmgebaseerd reactorsysteem. Oxidatiesnelheden worden normaliter weergegeven in $\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$, maar deze worden ook beïnvloed door de hoeveelheid biomassa, waardoor de weergave van specifieke activiteiten ($\text{mg N g}^{-1} \text{VSS d}^{-1}$) de voorkeur krijgt. De bepaling van gesuspendeerde biomassa (VSS) is een gestandaardiseerde analyse (Greenberg et al., 1992), maar een kwantificering van vastgehecht slib op PVA-carriers werd nog niet gestandaardiseerd. Het protocol werd samengesteld door verschillende extractiemethodes te bestuderen, verscheidene parameters zoals extractiesolvent, het aantal segmenten per carrier, schudden, extractietemperatuur, invloed van sonicatie en de extractieduur te variëren en zodoende het extractieprotocol te optimaliseren. Uiteindelijk werd de eiwitconcentratie bepaald met de Lowry methode.

Verschillende solventen kunnen gebruikt worden voor extractie van eiwitten uit slib. Natriumdodecylsulfaat (SDS) wordt vaak gebruik bij lyse van cellen in extractieprotocollen van DNA en eiwitten (Chen et al., 1998; Vilchez-Vargas et al., 2013). Door de amfipatische eigenschappen van SDS lost de celwand van micro-organismen op bij contact en komen proteïnen vrij. Maar de polaire eigenschappen van NaOH blijken mede krachtig genoeg voor extractie van eiwitten uit gesuspendeerd slib (Lerch et al., 1993). Beide opties werden in dit optimalisatieproces getest om vervolgens de eiwitconcentratie te bepalen met de Lowry methode. De compatibiliteit van het gebruikte solvent met de Lowry methode werd gecontroleerd via de kwaliteit van de standaardreeks. SDS blijkt te interfereren met het Folin reagens (Olsen & Markwell, 2007). Hierdoor hadden de stalen en standaardreeks nog steeds de gele kleur van het Folin reagens en kon de eiwitconcentratie niet bepaald worden. SDS blijkt wel compatibel te zijn met de bicinchonine acid proteïne assay, ook wel gekend als de Smith methode (Chen et al., 1998). Het gebruik van NaOH resulteerde in een heldere blauwe kleur van de standaardreeks en een R^2 die telkens groter was dan 0.98 waardoor extractie met dit solvent verder geoptimaliseerd werd.

Het schudden van stalen tijdens het extractieproces werd bewerkstelligd door stalen op een vortex te plaatsen. Dit apparaat zorgt voor de creatie van een kolk in de Falcon tube met excellente menging van carrierdelen en extractiesolvent tot gevolg. De kinetische kracht van de vloeistof zorgt mede voor een betere diffusie in de biofilm, wat extractie van eiwitten bevordert.

Sonicatie kent vele toepassingen in chemische laboratoria en industrieën. Chen et al. (1998) suggereren een sonische behandeling van 30 minuten om extractie van eiwitten te bewerkstelligen. Maar het effect van sonicatie wordt geïnduceerd door cavitatie, waarbij lokaal hoge temperaturen en drukken gegenereerd worden (Hwang, 2010). Dit kan resulteren in schade aan biologische materialen zoals eiwitten, waarbij hun structuur aangetast wordt. Een continue sonicatiebehandeling van 15 minuten in dit onderzoek blijkt een significant negatief effect te hebben op de

eiwitconcentratie in sectie 1.5 (deel 3). Stathopoulos et al. (2004) onderzocht de invloed van sonicatie op aggregaatvorming van eiwitten. Hierbij werden stalen onderworpen aan cyclussen bestaande uit 5 sonicatiepulsen van 1 seconde, gevolgd door een incubatieperiode van 1 minuut bij omgevingstemperatuur. De hoeveelheid sonicatie-geïnduceerde aggregaten waren proportioneel aan de dosis sonicatiebehandeling. Hieruit kan geconcludeerd worden dat deze procedurestap eiwitten van slib op carriers beschadigt.

Figuur 9 geeft aan dat de concentratie aan eiwitten niet significant wijzigt na een extractieduur variërend van 2 tot 21 uur. Dit impliceert naast de optimale en praktisch geprefereerde extractieduur van 2 uur, dat de gekozen extractietemperatuur niet resulteert in denaturatie van eiwitten.

2 Temperatuuropdrijving reactoren

2.1 Reactorperformantie

2.1.1 Vergelijking performantie van SBR en MBBR

Een sequencing batch reactor (SBR) en een moving bed biofilm reactor (MBBR) werden parallel opgestart om de performantie tijdens de temperatuuropdrijving te vergelijken en zodoende het ideale systeem te selecteren. Beide reactoren werden geïnoculeerd met ABIL, aangezien Vandekerckhove (2014) dit selecteerde als geschikt inoculum voor testen met temperatuurstijgingen. ABIL vertoonde namelijk de hoogste thermotolerantie (residuele activiteit van ammoniumoxiderende micro-organismen (AOM) en nitrietoxiderende bacteriën (NOB) op 40 °C relatief ten opzichte van deze op 34 °C) van de 4 geteste inocula: actief slib (Destelbergen), OLAND-RBC slib uit een roterende biologische contactor (LabMET, Gent), ABIL-slib (Avecom), B-stage slib (rechtstreeks uit Breda) en B-stage slib dat in een mebraan bioreactor synthetische urine nitrificeerde (LabMET, Gent, onrechtstreeks uit Breda). ABIL-slib wordt in Avecom gekweekt om de opstartperiode van het nitrificatieproces tijdens praktische toepassingen te reduceren, waardoor oxidatiesnelheden van AOM en NOB in de reactoren tijdens de stabilisatieperiode snel opgedreven werden. Na 10 dagen was de activiteit in de MBBR reeds gestabiliseerd, maar de biofilm was nog niet aanwezig (Figuur 11). In de SBR werd mede een langere stabilisatieperiode geprefereerd om CaCO_3 , waarop micro-organismen in ABIL-slib gekweekt werden, op te lossen en zodoende het anorganisch materiaal te verwijderen uit de reactor. Na 79 dagen was een visueel merkbare biofilm op de PVA-carriers aanwezig en was de VSS/TSS ratio in de SBR, na een herinoculatie op dag 33, gestegen tot 0.59.

ABIL-slib wordt bij Avecom gekweekt in een reactor waar specifieke activiteiten van AOM en NOB tussen 400 en 600 $\text{mg N g}^{-1} \text{VSS d}^{-1}$ bereikt worden. Deze snelheden werden in dit experiment niet gehaald, maar andere operatieparameters zoals temperatuur werden gehanteerd. De pilootreactor van Avecom werd geopereerd bij ± 20 °C, terwijl de minimumtemperatuur voor deze studie 37 °C was. Gedurende het hele experiment was de influentconcentratie in de SBR groter dan deze van de MBBR (Figuur 12). Aangezien de verwijderingsefficiëntie van NH_4^+ in beide reactoren voor hun daling in activiteit continu tussen 90 en 100 % gelegen was, was de volumetrische activiteit continu hoger in de SBR. Specifiek was het verschil minder uitgesproken, maar de SBR toonde ook hier hogere activiteiten. Het stikstofverlies bleef beperkt tot $10 \pm 8\%$ in de SBR en 11 ± 12 in de MBBR en deze resultaten waren niet significant verschillend ($p > 0.05$).

De MBBR werd continu geopereerd, maar in de SBR werd de performantie mede bepaald door bezinking. Hoge biomassaconcentraties benadelen dit proces, aangezien een compacte slibmassa onderworpen wordt aan compressie. Dit uit zich in een opwerkende kracht, tegengesteld aan de bezinking. In de praktijk worden in waterzuiveringsinstallaties concentraties vaak gecontroleerd tussen 2 en 4 g VSS L⁻¹, resulterend in gehinderde bezinking (Gaouar-Yadi et al., 2014). In de SBR werd de VSS-concentraties toch tussen 3 en 5 g VSS L⁻¹ gecontroleerd, om de verschillen met de MBBR te minimaliseren.

De waargenomen performantie van deze reactoren werd bepaald door de reactoren te voeden met synthetisch afvalwater. De NH₄⁺-N concentratie in huishoudelijk afvalwater is typisch 50 mg N L⁻¹ (Alcántara et al., 2015), wat lager is dan de influentconcentraties van beide reactoren voor hun crash. Industrieel afvalwater kan een hoger gehalte aan NH₄⁺ bevatten (UNEP Caribbean Environment Programme, 1998) en afhankelijk van de sector kunnen concentraties tot 1000 mg N L⁻¹ opgemeten worden. De activiteit in de SBR bij 49 °C was voldoende hoog om ook toegepast te worden bij deze hoge concentraties, in tegenstelling tot de performantie van de MBBR.

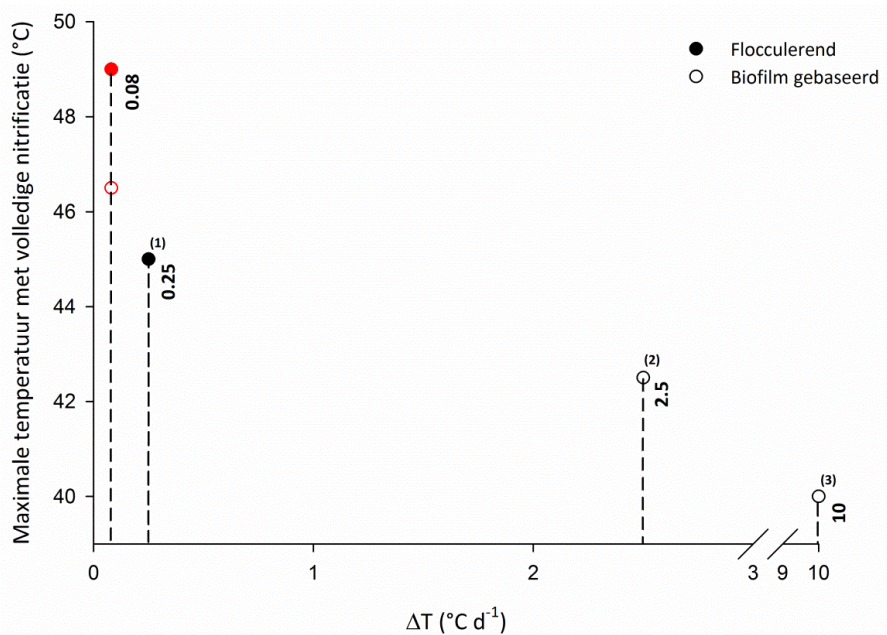
Tabel 14 toont de maximaal behaalde temperatuur met volledige nitrificatie en de bijhorende volumetrische en specifieke oxidatiesnelheden van AOM en NOB in dit experiment. Uit deze observaties kan geconcludeerd worden dat de SBR een beter reactorsysteem is om transitie van mesofiel nitrificerende organismen naar hogere temperaturen te bewerkstelligen. Enerzijds werd de hoogste temperatuur met volledige nitrificatie bereikt, anderzijds werden ammoniumconcentraties vergelijkbaar met industriële afvalwaters genitriciseerd. De AOM, in de SBR met partiële nitrificatie, bleken gevoelig te zijn voor verzuring, aangezien de activiteit daalde bij 49.5 °C. Uit resultaten van batchtesten kan geconcludeerd worden dat deze organismen in de SBR niet geïnhibeerd werden door de hoge temperatuur (Figuur 13). Verder onderzoek moet uitwijzen of de gevestigde gemeenschap kan herstellen en nitrificatie of enkel partiële nitrificatie nog kan bewerkstelligd worden bij hogere temperaturen.

Tabel 14: Samenvatting van maximaal behaalde temperatuur (°C) met bijhorende volumetrische (mg N L⁻¹ d⁻¹) en specifieke (mg N g⁻¹ VSS d⁻¹) activiteiten per reactor.

	Maximale temperatuur met volledige nitrificatie (°C)	Volumetrische snelheid bij maximale temperatuur (mg N L⁻¹ d⁻¹)	Specifieke snelheid bij maximale temperatuur (mg N g⁻¹ VSS d⁻¹)
SBR	49	839	156
MBBR	45.5	345	71

2.1.2 Vergelijking reactorperformantie met literatuur

Er bestaan reeds studies waarbij temperatuur opgedreven werd om thermofiele nitrificatie te bewerkstelligen, zowel in een SBR als in een MBBR. Figuur 23 toont de maximaal bereikte temperatuur met volledige nitrificatie in functie van de stapgrootte in temperatuuropdrijving van vorige studies en dit experiment (rode symbolen). Hierbij wordt mede onderscheid gemaakt tussen de 2 reactorsystemen. De nadruk ligt bij deze studies ook op nitrificatie op lange termijn.



Figuur 23: De maximaal behaalde temperatuur met volledige nitrificatie ($^{\circ}\text{C}$) in functie van de stapgrootte van de temperatuurstijging ($^{\circ}\text{C d}^{-1}$) van dit experiment (rode symbolen) en voormalige studies (⁽²⁾ Courtens, Boon, et al., 2014; ⁽³⁾ Shore et al., 2012; ⁽¹⁾ Vandekerckhove, 2014).

De eerste reactortest waar men thermofiele nitrificatie trachtte te bewerkstelligen door adaptatie van mesofiel slib, werd uit uitgevoerd door Shore et al. (2012). 3 MBBR reactoren werden parallel opgestart bij 30°C , gevolgd door een 1 temperatuurstijging van 5, 10 of 15°C in de 3 reactoren, resulterend in een eindtemperatuur van 35, 40 en 45°C . De 35°C -reactor bleek geen problemen te ondervinden met de temperatuurstijging en behaalde met secundair afvalwater een maximale nitrificatiesnelheid van $460 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De 40°C -reactor behaalde dezelfde nitrificatiesnelheid als de 35°C -reactor mits 4 weken adaptatie. De activiteit in de 45°C -reactor was nauwelijks merkbaar. De resultaten van de MBBR in deze studie leveren vergelijkbare nitrificatiesnelheden als de 40°C -reactor in Shore et al. (2012), maar door een lineaire temperatuurstijging kon in deze thesis volledige nitrificatie ook bij 45°C behaald worden met een snelheid van $307 \pm 73 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Een tweede reactortest was een fixed bed reactor en wordt beschreven in Courtens, Boon, et al. (2014). Hierbij werd slib gedurende 14 dagen gestabiliseerd bij 34°C , waarna de temperatuur stapsgewijs verhoogd werd. Initieel werd de temperatuur onmiddellijk verhoogd naar 40°C om vervolgens te stijgen met $2.5^{\circ}\text{C d}^{-1}$. Tussen elke temperatuurstijging kon slib 13 tot 74 dagen adapteren aan de nieuwe omgevingstemperatuur. Elke temperatuurstijging resulteerde in verlies van activiteit van AOM en deze micro-organismen herstelden gedeeltelijk tot niet. Volledige nitrificatie werd in deze reactor waargenomen tot 42.5°C aan een snelheid van $113 \pm 13 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Bij volgende temperatuurstijgingen kon geen activiteit meer opgemeten worden van AOM, maar door het toevoegen van NO_2^- werd duidelijk dat NOB een betere transitie naar hogere temperaturen vertonen. De hoogst behaalde temperatuur voor NOB was 47.5°C , met een activiteit $49 \pm 7 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Deze laatste temperatuurstijging (tot 47.5°C) resulteerde reeds in een significante daling in activiteit en deze activiteit werd slechts 5 dagen aangehouden. In deze studie werd tevens de invloed van zoutadditie ($9.5 \text{ g NaCl L}^{-1}$) getest bij een gelijkaardige opstelling en de maximale temperaturen voor volledige nitrificatie en nitratatie blijken mede 42.5 en 47.5°C te zijn. Toch blijft

zout een positief effect te hebben, aangezien volumetrische activiteiten van AOM en NOB bij hun maximale temperatuur respectievelijk $184 \pm 9 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en $302 \pm 21 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bedroegen. De AOM verloren enkel bij de eerste temperatuurstijging activiteit, maar herstelden volledig en bij de tweede stap werd geen significant verschil in activiteit opgemerkt, resulterend in de gerapporteerde activiteit. NOB verloren activiteit in de eerste temperatuurstijging, maar herstelden ook volledig. Vervolgens bleef de activiteit stabiel tot de laatste temperatuurstijging, waaruit geconcludeerd kan worden dat activiteit van NOB in deze reactor verloren ging bij $50 \text{ }^\circ\text{C}$, in tegenstelling tot $47.5 \text{ }^\circ\text{C}$ in de controlereactor. Opmerkelijke verschillen met de MBBR in deze studie zijn een verschillend inoculum, carriermateriaal en strategie, resulterend in lagere maximale nitrificatietemperatuur en -snelheid in het experiment van Courtens, Boon, et al. (2014).

De 3^{de} en meest vergelijkbare reactortest met deze studie wordt beschreven in Vandekerckhove (2014). 2 SBR reactoren werden parallel opgesteld en geïnoculeerd met ABIL-slib bij $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Na een stabilisatieperiode van 7 dagen werd de temperatuur verhoogd in beide reactoren. In 1 reactor werd de temperatuur lineair opgedreven met een snelheid van $0.25 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$ en aan de andere SBR werd eenzelfde gemiddelde, maar oscillerende temperatuurstijging met een amplitude van $2 \text{ }^\circ\text{C}$ toegekend. Beide reactoren bereikten $45 \text{ }^\circ\text{C}$, maar veel biomassa ging doorheen het experiment verloren. VSS-concentraties daalden van 2.24 naar $0.86 \text{ g VSS L}^{-1}$ en van 2.34 naar $0.46 \text{ g VSS L}^{-1}$ in respectievelijk de SBR met lineaire en oscillerende temperatuurstijging. Finaal werden activiteiten van AOM van respectievelijk 30 en $6 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ opgetekend en door de toediening van extra nitriet gedurende het experiment waren de activiteiten van de NOB respectievelijk 87 en $25 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De snelheden in de SBR met lineaire temperatuurstijging bij $45 \text{ }^\circ\text{C}$ in Vandekerckhove (2014) bleken 25 keer lager te liggen dan de snelheden van de AOM in de SBR bij $49 \text{ }^\circ\text{C}$ in deze studie. Door de gelijkens van deze 2 experimenten blijkt een trage temperatuurstijging ($0.08 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$ versus $0.25 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$) cruciaal.

Bij het bestuderen van deze 3 testen, met de bijhorende volumetrische oxidatiesnelheden, en deze studie kan geconcludeerd worden dat een lineaire, trage temperatuurstijging ($0.08 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$) resulteert in de hoogste temperatuur met volledige nitrificatie en de hoogste nitrificatiesnelheid. Er dient wel opnieuw vermeld te worden dat optimale vergelijkingen enkel gemaakt kunnen worden tussen specifieke activiteiten. Daarnaast blijken micro-organismen in een gesuspendeerd systeem een betere transitie naar hogere temperaturen te vertonen, ondanks de verwachte robuustheid tegen extreme condities van het biofilmgebaseerd reactorsysteem.

Ten gevolge van seizoenale temperatuurverschillen, worden biologische waterzuiveringsinstallaties mede onderworpen aan variërende watertemperaturen. Het verschil tussen minimale en maximale temperatuur kan tot $15 \text{ }^\circ\text{C}$ bedragen en een temperatuurstijging tussen 0.05 en $0.11 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$ wordt waargenomen (Ju et al., 2014; Siripong & Rittmann, 2007). Deze praktische temperatuuropdrijvingen zijn vergelijkbaar met de gekozen snelheid in deze studie ($0.08 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$).

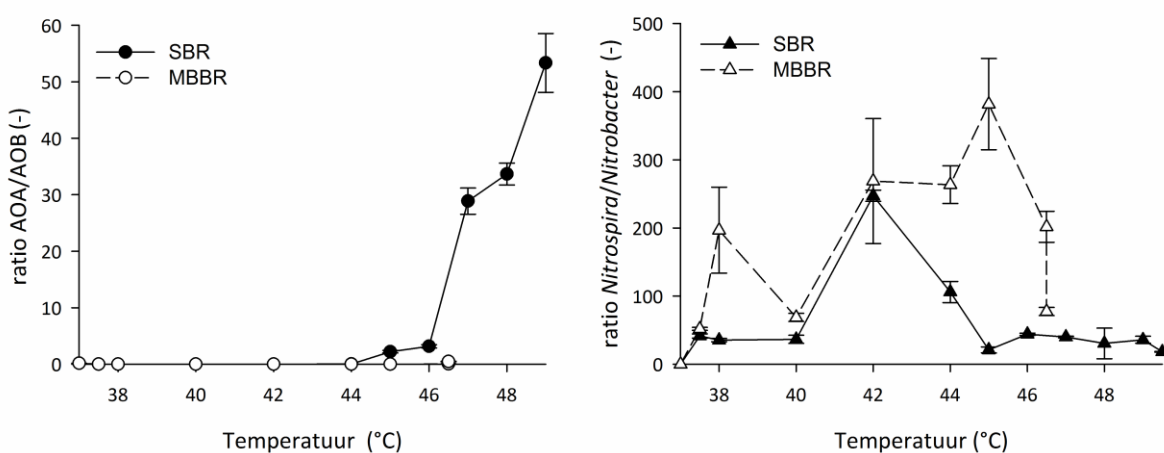
Indien deze strategie in de praktijk toegepast wordt, om transitie van mesofiele ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) naar thermofiele ($50 \text{ }^\circ\text{C}$) nitrificatie te bewerkstelligen, kan geopteerd worden voor een asymptotische temperatuuropdrijving. Initiëel wordt de temperatuur verhoogd met $0.5 \text{ }^\circ\text{C d}^{-1}$ en bij het bereiken van $40 \text{ }^\circ\text{C}$ wordt deze snelheid gehalveerd, gelijkaardig aan Vandekerckhove (2014), tot $42.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Deze studie toonde aan dat de groei van ammoniumoxiderende archaea (AOA) duidelijk werd vanaf $42 \text{ }^\circ\text{C}$

waardoor een daling tot $0.15 \text{ } ^\circ\text{C d}^{-1}$ bij $42.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ deze groei moet toelaten. Vanaf $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ wordt de snelheid verlaagd naar $0.08 \text{ } ^\circ\text{C d}^{-1}$, zoals in deze studie, tot $48 \text{ } ^\circ\text{C}$, aangezien geen problemen gemeld werden tot deze temperatuur. Vervolgens wordt de temperatuurstijging nog 1 keer gehalveerd ($0.04 \text{ } ^\circ\text{C d}^{-1}$) om uiteindelijk $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ te bereiken. De geschatte tijd voor dit temperatuurprofiel is 124 dagen.

2.2 Microbiële gemeenschapsanalyse

Tijdens het experiment werd de microbiële gemeenschap opgevolgd door middel van qPCR waarbij ammoniumoxiderende bacteriën (AOB), AOA, *Nitrobacter* en *Nitrospira* werden opgevolgd in functie van de tijd. Absolute resultaten worden weergegeven in Figuur 12 (D), maar een relatieve voorstelling is een duidelijkere weergave voor verschuivingen (Figuur 24).

Aanvankelijk waren AOB dominant in beide reactoren, maar doorheen het experiment werd een stijging van de ratio AOA/AOB waargenomen in de SBR, ten gevolge van een stijging van AOA en een daling van AOB. Deze ratiostijging werd duidelijk vanaf $45 \text{ } ^\circ\text{C}$, aangezien AOA hier dominant werden, maar was nog duidelijker te zien bij $47 \text{ } ^\circ\text{C}$. Absoluut werd een stijging van het aantal archaeaal *amoA* genen reeds waargenomen bij $42 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Figuur 12, D). Tabel 1 geeft ook weer dat vooral archaea geïsoleerd werden uit natuurlijke thermofiele omgevingen. Tussen de laatste 2 analyses (8 dagen) werd in deze reactor een opmerkelijke daling van dit ratio gedetecteerd. Deze resultaten tonen aan dat AOA afsterven na de verzuring van de reactor ten gevolge van het technisch probleem van de pH controller bij $49.5 \text{ } ^\circ\text{C}$. Figuur 12 (D) toont mede een stijging van archaeaal *amoA* in de MBBR, maar deze startte bij $44 \text{ } ^\circ\text{C}$ en ging door tot de crash. De latere groei van AOA in de MBBR kan verklaard worden door de betere resistentie van de toen heersende microbiële gemeenschap tegen extreme condities zoals hoge temperaturen (Kulikowska et al., 2009). Op Figuur 24 is te zien dat de ratio AOA/AOB in deze reactor nooit aanzienlijk steeg, aangezien AOA nooit dominant werden. Wellicht zou in dit systeem eveneens thermofiele nitrificatie bewerkstelligd kunnen worden, als een langzamere temperatuurstijging toegepast wordt. Zodoende worden de groei en dominantie van AOA mogelijk gemaakt. Dit moet echter nog verder bestudeerd worden.



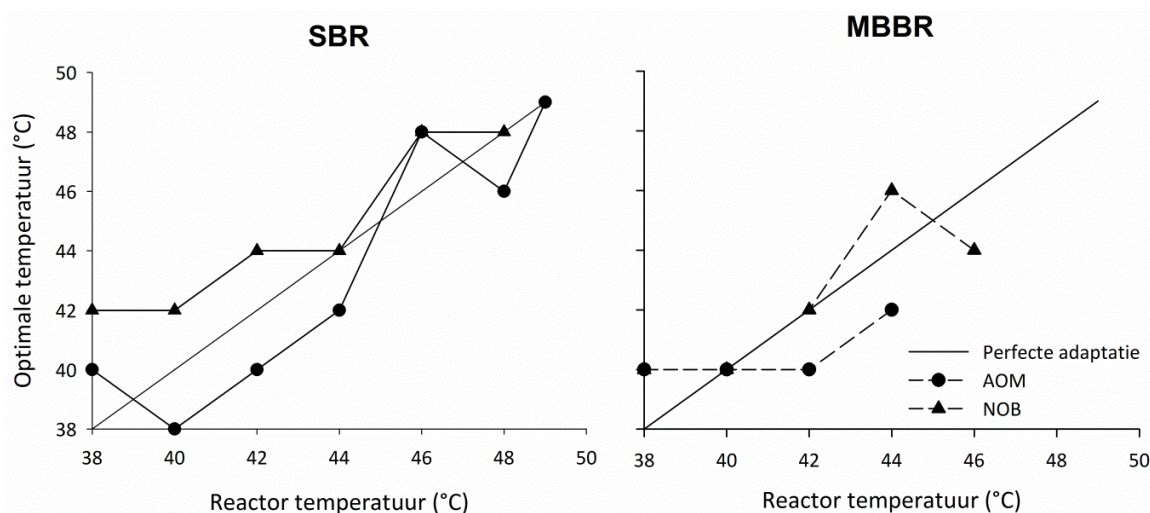
Figuur 24: Ratio AOA/AOB (-) (links) en *Nitrospira/Nitrobacter* (-) (rechts) in functie van de operatietijd (d).

Nitrospira was doorheen het experiment het dominante genus (Figuur 12, D), wat ook voorspeld werd, aangezien dit genus geïsoleerd werd uit thermofiele omgevingen (Tabel 1). Figuur 24 toont een initiële stijging in de ratio *Nitrospira/Nitrobacter* in beide reactoren. De ratio's worden weergegeven op 2 verschillende assen waarbij de y-as van de NOB een factor 10 groter is dan deze van de AOM. Vanaf 42 °C werd een daling waargenomen in de SBR en deze werd tevens waargenomen in de MBBR, maar pas vanaf 45 °C. Dit kan wijzen op een tweede shift in NOB doorheen het experiment. Finaal was de ratio in de MBBR nog 77 ± 6 in tegenstelling tot 18.2 ± 0.6 in de SBR.

2.3 Temperatuuradaptatie

Batchtesten werden uitgevoerd om adaptatiecapaciteit van micro-organismen op te volgen. Figuur 25 geeft de optimale temperatuur weer in functie van de toenmalige reactortemperatuur voor AOM en NOB in beide reactoren. De geteste temperatuur met de hoogste activiteit tijdens elke batchtest wordt aanvaard als optimale temperatuur. Perfecte adaptatie aan de temperatuurstijging moet resulteren in een gelijke optimale temperatuur en reactortemperatuur.

Een initieel gelijkaardige trend van AOM kon waargenomen worden in beide reactoren. Bij de start van het experiment (reactortemperatuur 38°C) was 40 °C de optimale temperatuur, maar deze was niet meer gewijzigd, waardoor de optimale temperatuur vervolgens lager was dan de reactortemperatuur op 42°C. Uiteindelijk daalde de activiteit in de MBBR, waardoor geconcludeerd kan worden dat deze micro-organismen nooit geadapteerd zijn aan de hogere temperatuur. In de SBR vond een shift plaats tussen 44 en 46 °C, wat ook op te merken is in Figuur 25 door een stijging van optimale temperatuur boven de perfecte adaptatie-as. Deze omschakeling is wellicht te wijten aan een dominantie van AOA in de SBR (Figuur 12, D) waardoor selectie en niet adaptatie kan besloten worden. Vervolgens lijkt de optimale temperatuur te convergeren met de perfecte adaptatie-as.



Figuur 25: Optimale temperatuur (geteste temperatuur met de hoogst opgemeten activiteit tijdens batchtesten) in functie van de toenmalige reactortemperatuur.

De optimale temperatuur van de NOB was in de SBR gedurende het hele experiment hoger dan of gelijk aan de reactortemperatuur. Figuur 25 laat echter niet toe voorspellingen te maken, in tegenstelling tot Figuur 13, waaruit blijkt dat de activiteit bij een temperatuurstijging van 48 naar

50 °C opmerkelijk zou dalen. In de MBBR werd, met uitzondering van de laatste test, ook een optimale temperatuur waargenomen die wijst op goede transitie van NOB naar hogere temperaturen. Bij de laatste batchtest van deze reactor, was de optimale temperatuur echter lager dan de reactortemperatuur, maar op dat moment was de activiteit van de AOM in de reactor reeds met 73 % gedaald, wat de activiteit van deze micro-organismen in de batchtest benadeelt.

2.4 Vrij ammoniak

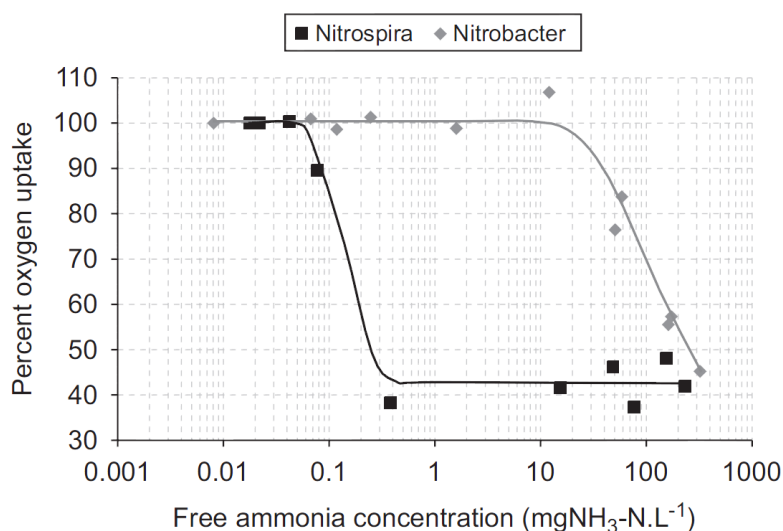
Bij het bestuderen van de relatieve activiteiten in functie van vrij-ammoniakconcentraties doorheen het experiment (Figuur 14), kan een algemene trend waargenomen worden. In de SBR werden AOM niet meer gestimuleerd en NOB werden geïnhibeerd, naarmate het experiment vorderde. Een tegengestelde conclusie kan gemaakt worden voor de MBBR, aangezien de stimulatie van AOM versterkt werd en NOB niet meer geïnhibeerd werden bij hogere temperaturen.

Zowel archaea als bacteriën waren aanwezig in ABIL, om NH_4^+ te oxideren. Aanvankelijk werd ammoniumoxidatie gestimuleerd door hogere vrij-ammoniakconcentraties. Uit temperatuur-activiteitscurven bleek dat een shift plaatsgevonden had tussen 44 en 46 °C in de SBR (Figuur 13), wat bevestigd wordt met qPCR resultaten (Figuur 12, D). Bij 46 °C bleek AOA dominant te zijn en met een daling in AOB werd simultaan een daling in stimulatie opgemerkt. In de MBBR werden AOM gedurende het hele experiment gestimuleerd door vrije ammoniak, maar moleculaire analyses tonen aan dat de abundantie aan AOA pas steeg bij 44 °C en nooit het dominant werd. Yasuda et al. (2013) toonden aan dat in een biofilter een stijging in vrij ammoniak resulteerde in wijzigingen in microbiële gemeenschap van zowel AOA als AOB op lange termijn. De resulterende dominante *amoA* sequenties waren gerelateerd aan Thaumarchaeotal Group I.1b voor de AOA en *Nitrosomonas europaea* lineages en 1 subcluster binnen *Nitrospira* sp. cluster 3 voor de AOB. Waarschijnlijk waren de aanwezige AOB in dit experiment verwant met deze organismen en de AOA niet, waardoor hun gevoeligheid duidelijk merkbaar is. Vadivelu et al. (2006) toonden eveneens aan dat een *Nitrosomonas* cultuur niet geïnhibeerd wordt door vrij ammoniak tot concentraties van 16 mg N/L. Het uitvoeren van bijvoorbeeld FISH op stalen kan in dit experiment meer duidelijkheid brengen over het specifieke genus in deze reactoren.

Nitrietoxidatie wordt uitgevoerd door NOB en zowel het 16S gen van *Nitrospira* als *Nitrobacter* werden gedetecteerd in het slib van beide reactoren. Figuur 26 toont het resultaat van een onderzoek naar inhibitie van deze organismen door vrij ammoniak (Blackburne et al., 2007b). Hieruit blijkt dat *Nitrospira* bij lage vrij-ammoniakconcentraties reeds geïnhibeerd wordt, in tegenstelling tot *Nitrobacter*. *Nitrospira* heeft een lagere half-saturatiecoëfficiënt ($0.9 \pm 0.07 \text{ mg N L}^{-1}$ versus $1.3 \pm 0.08 \text{ mg N L}^{-1}$) en een hogere slibproductie ($0.15 \pm 0.04 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ versus $0.072 \pm 0.01 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$) dan *Nitrobacter* waardoor dit genus enkel bevoordeeld wordt bij lagere ammonium- en nitrietconcentraties. Figuur 12 (D) toont een dominantie van *Nitrospira* over het hele experiment in beide reactoren, zodat het verschil in FA gevoeligheid niet kan worden toegeschreven aan een verschil in genus. In de SBR werd rond 44°C echter wel een daling van de ratio *Nitrospira/Nitrobacter* geobserveerd terwijl die in de MBBR nog steeg (Figuur 24). Er vond dus waarschijnlijk een tweede shift plaats wat het verschil in inhibitie kan verklaren. Door de blijvende dominantie van *Nitrospira* is het ook mogelijk dat een andere soort van het genus *Nitrospira* nitrataat uitvoert. Simm et al. (2006) onderzochten de inhibitie van *Nitrospira* door vrij ammoniak in

gemengde en pure cultuur (*Nitrospira moscoviensis*) en concludeerden een afwezigheid van inhibitie tot vrij-ammoniakconcentraties van 10 mg N L⁻¹ in beide situaties. Tabel 1 vermeldt ook de aanwezigheid van deze pure cultuur in thermofiele omgevingen, waardoor deze NOB waarschijnlijk dominant waren tot de shift rond 42-44 °C in de SBR en finaal in de MBBR. Vanaf 46 °C reageerden de NOB in de SBR volgens de observaties in Blackburne et al. (2007b) (Figuur 14). Het realiseren van sequencing op de stalen moet hier uitsluitel over geven. Een derde mogelijke verklaring voor de resistentie tegen vrij ammoniak is diffusielimitatie van vrij ammoniak in de carrier (Bakti & Dick, 1992). Diffusiesnelheid wordt door de wet van Fick beschreven (9) en zolang een concentratiegradiënt (∇n) aanwezig is, vindt diffusie plaats. Diffusiviteit (D) van NH₄⁺ in water in de PVA-carriers, bepaalt de snelheid van concentratieopbouw en bedraagt 1860 μm² s⁻¹ (Kreft et al., 2001).

$$J = -D\nabla n \tag{9}$$

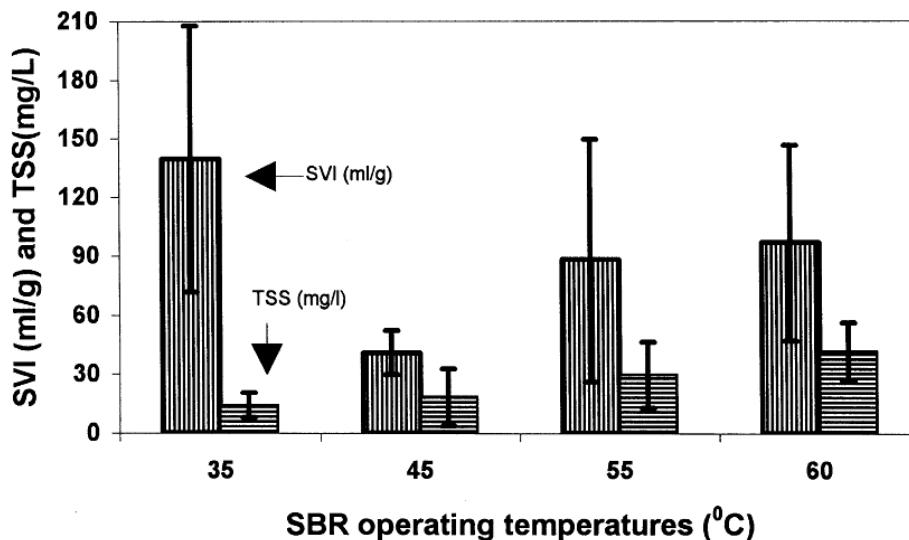


Figuur 26: Inhibitie van *Nitrospira* en *Nitrobacter* in functie van de vrij-ammoniakconcentratie (mg N L⁻¹) bij 25 °C (Blackburne et al., 2007b).

2.5 Slibkarakteristieken

2.5.1 Slibvolume-index (SVI₅) en slibretentietijd (SRT)

De SVI₅ werd in dit experiment op verschillende momenten, overeenstemmend met verschillende temperaturen, bepaald. Tripathi & Grant Allen (1999) bepaalden de SVI₃₀ van COD-verwijderend actief slib in 4 SBR reactoren bij 35, 45, 55 en 60 °C (Figuur 27). De absolute waarden kunnen niet vergeleken worden met deze studie aangezien deze bepaald werden na 5 minuten in plaats van na 30. In literatuur wordt filamenteuze groei waargenomen bij mesofiel slib, resulterend in een hoge SVI₃₀ en slechtere bezinking, maar deze kan gedeeltelijk gecontroleerd worden door SRT te reduceren. Operatie bij 45 °C bleek de laagste SVI₃₀ te hebben en de overige reactoren hadden opnieuw een hogere SVI₃₀. Een daling in SVI, kon in dit experiment ook waargenomen worden bij 46 en 48 °C (Figuur 15), conform met deze studie.



Figuur 27: De slibvolume-index na 30 minuten en de TSS concentratie van het effluent van 4 SBR reactoren, werkend bij 4 verschillende temperaturen (Tripathi & Grant Allen, 1999).

In de geschiedenis is de kwaliteit van bezinking in functie van temperatuur echter niet eenduidig bepaald. Analoog aan Tripathi & Grant Allen (1999) besloten Cetin & Surucu (1990) en Flippin & Eckenfelder (1994) een daling in bezinkbaarheid met een stijging in temperatuur (30-60 °C). In tegenstelling tot deze resultaten, concludeerden Barr et al. (1996) geen verschil in bezinking tussen operatietemperaturen 40 en 50 °C en besloten Rintala & Lepisto (1993) geen slechte bezinking bij 55 °C.

Om transitie naar hogere temperaturen te bewerkstelligen, kan SRT een belangrijke parameter zijn. De SRT voor de MBBR werd verondersteld oneindig te zijn aangezien geen carriers verwijderd werden uit deze reactor om deze parameter te controleren. De SRT in de SBR werd ook niet gecontroleerd waardoor deze bij berekeningen 81 ± 25 d blijkt te zijn. In deze studie blijkt deze parameter niet de drijfveer voor adaptatie of selectie te zijn aangezien wijzigingen in microbiële gemeenschap in de SBR waargenomen worden in een tijdsduur die korter is dan de SRT van de SBR (Figuur 12, D).

2.5.2 Slibproductie (Y_{obs})

De waargenomen slibproductie werd doorheen het experiment op verschillende temperaturen bepaald (Figuur 16). In de SBR daalde deze van 0.07 tot 0.04 bij het bereiken van 42 °C waarna deze opnieuw steeg tot 0.07 bij 48 °C. In de MBBR daalde de waargenomen slibproductie van 0.11 tot -0.95, waardoor de afsterving van biomassa bij 46 °C bevestigd wordt. Deze waarde is de gemiddelde slibproductie voor AOM en NOB, aangezien zowel nitritatie als nitratatie uitgevoerd werden. Tekstboeken geven eveneens slibproductie voor gemeenschappen (AOM en NOB) weer: $0.21 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ (Barnes & Bliss, 1983), $0.19 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ (Wiesmann, 1994) en $0.20 \text{ g VSS g}^{-1} \text{ N}$ (Henze et al., 2008). Deze waarden uit literatuur kunnen enkel vergeleken worden met de eerst bekomen waarde in dit experiment, aangezien de initiële temperatuur (38 °C) in de optimale temperatuurrange van deze micro-organismen gelegen is (Blackburne et al., 2007b; Shimaya & Hashimoto, 2011). De waarden in dit onderzoek zijn lager, ondanks de groei van heterotrofen door het lekken van organische koolstof door autotrofen of door afsterven van organische koolstof. De

lagere waarde kan het gevolg zijn een verschil in temperatuur, waarbij hoge temperaturen (> 38 °C) afsterving van micro-organismen bevorderen.

Blackburne et al. (2007b) verklaarden dat de eigenlijke slibproductie, door correctie van de waargenomen slibproductie voor SRT en decompositie, voor *Nitrospira* 0.15 ± 0.04 g VSS g⁻¹ N bedraagt. In een tweede onderzoek bepaalden Blackburne et al. (2007a) de eigenlijke slibproductie voor *Nitrosomonas* en *Nitrobacter*, respectievelijk 0.14 ± 0.02 en 0.072 ± 0.01 g VSS g⁻¹ N. De onderzoeken werden uitgevoerd bij 23 ± 1 en 21 ± 2 °C respectievelijk. Deze waarden kunnen echter niet rechtstreeks vergeleken worden met de resultaten deze studie aangezien hier de geobserveerde en niet de eigenlijke slibproductie berekend werd.

De daling in slibproductie in de SBR stopt bij 42 °C, waarna deze waarde opnieuw steeg. Dit kan verklaard worden door de shift van AOM: de groei van AOA. (Figuur 12, D). Martens-Habbena et al. (2009) bepaalden de slibproductie van *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* strain SCM1, een mesofiel crenarchaeon, en rapporteerden een slibproductie van 0.07 g VSS g⁻¹ N. Martens-Habbena et al. (2009) vermeldden ook gelijkaardige slibproducties voor de thermofiele aangerijkte culturen *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* en *Candidatus Nitrososphaera gargensis*.

3 Kosten-batenanalyse: mesofiele versus thermofiele nitrificatie

Voor implementatie van het systeem in de praktijk is een economische studie noodzakelijk. In deze thesis wordt enkel de vermoedelijke impact van de transitie naar hogere temperaturen op de belangrijkste parameters, met invloed op de investeringskosten (CAPEX) en operationele uitgaven (OPEX), besproken (Tabel 12).

Tabel 15: Verschuiving in performantie en kosten bij thermofiele ten opzichte van mesofiele systemen, beschreven in literatuur (Lapara & Alleman, 1999; Tripathi & Grant Allen, 1999; Vogelaar et al., 2000).

Parameter (mesofiel → thermofiel)	Gevolg	CAPEX	OPEX
O ₂ -oplosbaarheid ↓	Beluchting ↑	-	↑
Koelingsbehoefte ↓	Nood aan warmtewisselaar/koeltorens ↓	↓	↓
Slibproductie ↓	Slibverwerkingskosten ↓	-	↓
Oxidatiesnelheid ↑	Reactorvolume ↓	↓	-
Hygiënisatie ↑	Nood aan desinfectie ↓	↓	↓

↑: Stijging van de parameter bij transitie van een mesofiel naar een thermofiel nitrificatiesysteem

↓: Daling van de parameter bij transitie van een mesofiel naar een thermofiel nitrificatiesysteem

- : Geen invloed op de parameter bij transitie van een mesofiel naar een thermofiel nitrificatiesysteem

De O₂-oplosbaarheid is negatief gecorreleerd met de temperatuur waardoor thermofiele aerobe organismen benadeeld worden (Vogelaar et al., 2000). Ondanks de gedeeltelijke compensatie van een hogere overdrachtscoëfficiënt, zal dit negatieve effect geneutraliseerd moeten worden door extra beluchting. Ongeveer 8% van alle operationele kosten zijn aeratiekosten (Courstens, Meerburg

et al., 2014) en ten gevolge van extra beluchting kan deze enkel stijgen. Indien de O₂-concentratie onvoldoende blijkt te zijn voor optimale operatie, kan puur zuurstofgas toegevoegd worden in plaats van lucht, aangezien O₂ slechts 21% van het geheel uitmaakt.

De slibproductiekost is ongeveer een derde van de operationele kosten en is hiermee de grootste bijdrage. Daling in slibproductie bij thermofiele operatie wordt beschreven in Tripathi & Grant Allen (1999) voor aerobe heterotrofen en in Courtens, Vlaeminck et al. (2014) voor anaerobe heterotrofen. Dit zou een cruciale factor kunnen zijn bij implementatie van deze systemen. Deze studie toonde echter aan dat de slibproductie van de autotrofe nitrificeerders bij 48 °C overeenkomstig was aan deze van 38 °C. Door de te verwaarlozen slibproductie van autotrofen, in vergelijking met heterotrofen en door de aanwezigheid van zowel stikstof als COD in afvalwater, zal de totale slibproductie dalen bij thermofiele operatie.

De reactiesnelheid in functie van de temperatuur wordt beschreven door de van 't Hoff-Arrhenius vergelijking en een hogere temperatuur moet volgens deze vergelijking resulteren in hogere snelheden. Tripathi & Grant Allen (1999) concludeerden echter een lagere COD-verwijdering vanaf 45 °C door aerobe heterotrofen. Daarnaast besloten Courtens, Vlaeminck et al. (2014) een halvering van de denitrificatieactiviteit in een thermofiele reactor (55 °C) ten opzichte van een mesofiele reactor (34 °C). De specifieke oxidatiesnelheden van AOM en NOB in dit experiment, bekomen in batchtesten, fluctueerden doorheen het experiment, maar een globale dalende trend is ook zichtbaar, voor alle micro-organismen in beide reactoren. De activiteit van de AOM daalde in de SBR en de MBBR met respectievelijk 71 en 100 % en deze van de NOB daalden met respectievelijk 33 en 59 %.

Tot slot resulteert operatie bij thermofiele temperaturen tot inactivatie van pathogenen (Lapara & Alleman, 1999). Afhankelijk van de hydraulische verblijftijd en temperatuur, kan zelfs een volledige hygiënisatie van thermofiele systemen bekomen worden. Hierdoor kunnen voor specifieke sectoren zowel investerings- als exploitatiekosten gedrukt worden.

Ondanks de lagere biodegradatiesnelheid van COD en verwijdering van stikstof, ligt het binnen de verwachting dat thermofiele systemen toch leiden tot kostenbesparing, gezien slibbehandeling één van de grote kostenposten binnen de biologische waterzuivering is. Naast de behandeling van warme afvalstromen, kan deze techniek ook gebruikt worden in industrieën met beschikbare restwarmte en zodoende genieten van deze voordelen.

DEEL 5: CONCLUSIE

In deze thesis werd getracht thermofiele nitrificatie te bewerkstelligen via transitie van mesofiel slib naar hogere temperaturen.

In de eerste fase werden 2 reactorsystemen, een gesuspendeerd (SBR) en een biofilmgebaseerd (MBBR), parallel opgesteld en werd het toegevoegde inoculum, ABIL, gedurende 79 dagen bij 38 °C gestabiliseerd. Op de toegevoegde PVA-carriers werd een biofilm gevormd en simultaan steeg het organisch gehalte van de zwevende stof in de SBR. Tijdens deze periode werd tevens een methode voor biomassabepaling op PVA-carriers geoptimaliseerd. Via een eiwitmeting, gevolgd door bepaling van de eiwitconcentratie met de Lowry-methode, werd de biomassaconcentratie berekend. Eiwitextractie werd bewerkstelligd door PVA-carriers in stukken te snijden en NaOH (1M) toe te voegen, waarna stalen gedurende 2 uur in een warmwaterbad op 46.5 °C geplaatst werden en op regelmatige basis geschud werden. De ratio eiwitconcentratie/VSS-concentratie werd bepaald op het toenmalig aanwezig gesuspendeerd slib in de MBBR en bedroeg 0.31.

In de tweede fase werd de temperatuur in beide reactoren lineair verhoogd (0.16 °C d⁻¹ tot 40 °C en vervolgens 0.08 °C d⁻¹) en de performantie werd vergeleken. Er werd aangetoond dat een gesuspendeerd reactorsysteem betere transitie naar hogere temperaturen vertoont door enerzijds hogere temperaturen met volledige nitrificatie en anderzijds hogere oxidatiesnelheden te bereiken. De verklaring hiervoor is een latere shift in microbiële gemeenschap naar thermofiele micro-organismen en het nooit dominant worden van AOA in de MBBR. De maximale temperatuur, met een volledige nitrificatieactiviteit, in de MBBR was 45.5 °C met een oxidatiesnelheid van 87 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ (358 mg N L⁻¹ d⁻¹), in tegenstelling tot 155 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ (776 mg N L⁻¹ d⁻¹) bij 49 °C in de SBR. Vanaf 45.5 °C viel nitritatie in de MBBR stil en bij 46.5 °C werd de temperatuuropdrijving in deze reactor gestopt. In de SBR daalde de activiteit van de NOB vanaf 49 °C waardoor geëvolueerd werd naar een systeem met partiële nitrificatie tot 49.5 °C. De residuele snelheid van AOM bedroeg 145 mg N g⁻¹ VSS d⁻¹ (654 mg N L⁻¹ d⁻¹), maar door een verzuring in de reactor daalde ook deze activiteit opmerkelijk.

Tijdens de temperatuuropdrijving werden onder meer batchtesten uitgevoerd om adaptatiecapaciteit van micro-organismen in de reactoren op te volgen. Door de activiteit van slib uit de reactoren te testen op reactortemperatuur, 2 graden hoger en 2 graden lager, konden mede voorspellingen gemaakt worden voor mogelijke activiteit bij verdere temperatuurstijgingen. Het vermoeden van een dalende activiteit van AOM na 44 °C in de MBBR en van NOB na 48 °C in de SBR, waargenomen tijdens batchtesten, werd werkelijkheid in de reactoren. Daarnaast was de shift van AOB naar AOA ook op te merken in deze testen, door het wijzigen van de temperatuur met de hoogste activiteit, van een lagere naar hogere temperatuur dan de toen heersende reactortemperatuur. Deze testen kunnen dus gebruikt worden in toekomstige experimenten om het falen van reactoren te voorspellen en dit trachten te vermijden door de strategie aan te passen.

In batchtesten werd ook de gevoeligheid voor vrij ammoniak bepaald, van zowel AOM als NOB in beide reactoren. AOM vertoonden aanvankelijk in beide reactoren hogere activiteit bij hogere vrij-ammoniakconcentraties. Met een dominantie van AOA in de SBR daalde deze stimulatie, in tegenstelling tot nog hoger activiteiten in de MBBR, waar de shift van AOB naar AOA niet plaatsvond. Initieel werden NOB geïnhibeerd door vrij ammoniak in beide reactoren. Stijging van temperatuur resulteerde in beide reactoren in een stijging van de ratio *Nitrospira/Nitrobacter* waardoor de inhibitie minder uitgesproken werd in de SBR en afwezig werd in de MBBR. De laatstgenoemde ratio daalde echter opnieuw in de SBR en de resistentie van NOB tegen vrij ammoniak werd zeer klein vanaf 46 °C, resulterend in een IC₅₀ van 0.67 mg N/L. In de MBBR werd finaal geen inhibitie opgemerkt van AOM en NOB voor vrij-ammoniakconcentraties tot respectievelijk 5 mg N L⁻¹ bij 46 °C en 5.65 mg N L⁻¹ bij 48 °C.

Tot slot werden de SVI₅ in de SBR en de slibproductie in de twee reactoren bepaald op regelmatige tijdstippen. De bezinkbaarheid van het slib verbeterde doorheen het experiment, simultaan met de shift van AOB naar AOA en de tweede shift in NOB. De wijziging in slibproductie in de SBR correleerde tevens met de shift van AOB naar AOA. In de MBBR was de afsterving van slib duidelijk te zien bij 46 °C.

De methode ontwikkeld in deze thesis is, voor zover bekend in literatuur, de eerste succesvolle methode om een mesofiel nitrificerend systeem om te vormen tot een thermofiele reactor. Voor deze strategie, met lineaire temperatuuropdrijving, blijkt het gesuspendeerd systeem de beste optie.

DEEL 6: TOEKOMSTIG ONDERZOEK

In deze studie werd een grote vooruitgang geboekt op ontwikkeling van thermofiele nitrificatie, maar vooraleer dit in de praktijk gebruikt kan worden, moet er nog meer onderzoek uitgevoerd worden. Enkele suggesties worden hier meegegeven:

- De bekomen DNA-stalen kunnen verder geanalyseerd worden, om zo de specifieke micro-organismen te identificeren, door illumina sequencing uit te voeren. Hierdoor kan het inzicht in deze strategie verhoogd worden.
- De operatie van de reactoren werd na mijn thesis voortgezet, waardoor deze gebruikt kunnen worden voor verder onderzoek op LabMET:
 - De activiteit in de SBR trachten te herstellen.
 - De activiteit in de MBBR ook trachten te herstellen op de bekomen temperatuur (46.5 °C). Dit stimuleert de groei of het behoud van AOA en de afsterving van AOB. Wanneer AOA dominant worden in deze reactor, kan de temperatuur verder verhoogd worden.
 - Toevoegen van carriermateriaal aan de (herstelde) SBR en zodoende een biofilm vormen. De biofilm wordt samengesteld uit micro-organismen die in staat zijn tot thermofiele nitrificatie en deze biofilm is normaliter beter beschermd tegen mogelijke praktische stresssituaties.
- De toepasbaarheid van het systeem (SBR en MBBR) testen met situaties uit de praktijk:
 - Temperatuurschommelingen
 - pH-schommelingen
 - Aanwezigheid van giftige componenten
 - Afvalwater uit de praktijk voeden
- Een reactorsysteem opstellen om volledige stikstofverwijdering te bewerkstelligen (nitrificatie en denitrificatie bij hoge temperaturen).

DEEL 7: DUURZAAMHEID OP LABMET

In een eindige wereld is duurzaamheid een begrip dat, door de huidige Westerse levensstijl, doorheen de jaren aan belang won. In 1987 werd voor het eerst een aanvaardbare definitie gegeven aan duurzame ontwikkeling: “Duurzame ontwikkeling is de ontwikkeling die voorziet in de behoeften van de huidige generatie zonder de mogelijkheden van toekomstige generaties in gevaar te brengen om in hun behoeften te voorzien” (Brundtland-rapport). De 3 belangrijkste pijlers hierbij zijn milieu, economie en maatschappij en LabMET wil een bijdrage leveren tot elk van deze aspecten. Onderzoek naar gebruik van micro-organismen in talrijke domeinen (bijvoorbeeld waterzuivering, geneeskundige toepassingen en elektrokatalyse) moet de druk op het milieu verlagen. Vanuit economisch standpunt wordt veel geregeld door het begrip schaarste, maar milieugoederen worden vaak verwaarloosd. Door onderzoek naar recuperatie van grondstoffen (bijvoorbeeld biometalurgie) of vervanging van bestaande grondstoffen moet opnieuw een evenwicht gevonden worden tussen economie en milieu. Ten slotte wordt er door het internationale karakter van LabMET geluisterd naar verschillende nationaliteiten en culturen en op deze manier wordt onderzoek op een efficiënte manier uitgevoerd, met aandacht voor noden van andere landen. Daarnaast word je als student bij talrijke activiteiten betrokken en voel je je, na de vele uren in het labo, toch deel van deze jonge, dynamische groep. Ondanks de talrijke inspanningen zijn er nog verbeteringen mogelijk om de duurzaamheid op LabMET te optimaliseren.

Mijn thesisonderwerp draagt bij tot de transitie naar een duurzamere wereld enerzijds door in een waterzuiveringsinstallatie het koelingsproces van water overbodig te maken of door restwarmte te gebruiken, die anders verloren gaat. Anderzijds verlaagt het de stikstofvervuiling van het milieu. Maar de reactoren werden voor dit onderzoek in een laboratorium geplaatst, dat constant op 34 °C verwarmd werd. Ondanks verwarming van de faculteit via cogeneratie, wat reeds een duurzaamheidsbevorderende aanpak is, is dit zeer energie-intensief. Tijdens het schooljaar steeg het aantal opstellingen in dit laboratorium, waardoor deze kamer en de overeenstemmende energiegroestoffen wel optimaler benut werden. Een 2^{de} kritiek omtrent duurzaamheid van mijn thesis is het vaak gebruikte (837 stalen), maar milieuvriendelijke protocol van de Nessler-methode, door het gebruik van kwik. Een nauwkeurig alternatief hiervoor is het gebruik van de techniek ionenuitwisselingschromatografie, waarbij de kolom opgebouwd is uit anionen om kationen te kunnen scheiden. Ten slotte werden gedurende het volledige reactorexperiment veel batchtesten uitgevoerd, resulterend in 21005 analyses (standaardreeks en stalen) in 96 well platen. Ondanks de inspanningen om tipjes maximaal te hergebruiken, werden voor alle analyses bijna 2 keer zoveel plastic exemplaren gebruikt en weggegooid. Door de kleine volumes is het gebruik van glazen pipetten niet mogelijk, maar worden de hoeveelheden chemicaliën drastisch geminimaliseerd.

Een algemene kritiek op duurzaamheid bij het indienen van een masterproef, is de verplichting tot papieren versies. In het huidige computertijdperk zouden grote hoeveelheden papier bespaard kunnen worden, indien deze enkel digitaal afgegeven moeten worden.

DEEL 8: REFERENTIES

- Alcántara, C., Muñoz, R., Norvill, Z., Plouviez, M. & Guieysse, B. (2015). Nitrous oxide emissions from high rate algal ponds treating domestic wastewater. *Bioresource Technology*, *177*, 110–117.
- Almstrand, R., Persson, F., Daims, H., Ekenberg, M., Christensson, M., Wilén, B.-M., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2014). Three-dimensional stratification of bacterial biofilm populations in a moving bed biofilm reactor for nitrification-anammox. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(2), 2191–2206.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. & Srinath, E. G. (2015). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous-acid. *Journal Water Pollution Control Federation*, *48*(5), 835–852.
- Bakti, N. A. K. & Dick, R. I. (1992). A model for a nitrifying suspended-growth reactor incorporating intraparticle diffusional limitation. *Water Research*, *26*(12), 1681–1690.
- Barnes, D. & Bliss, P. J. (1983). *Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment*. London: UK:E. & F.N. Spon.
- Barr, T. A., Taylor, J. M. & Sheldon, J. B. D. U. F. F. (1996). Effects of HRT, SRT and temperature on the performance of activated sludge reactors treating bleached kraft mill effluent. *Water Research*, *30*(4), 799–810.
- Barwal, A. & Chaudhary, R. (2014). To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *13*(3), 285–299.
- Bernhard, A. (2010). The Nitrogen Cycle : Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*, *3*(10).
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z. & Keller, J. (2007a). Determination of Growth Rate and Yield of Nitrifying Bacteria by Measuring Carbon Dioxide Uptake Rate. *Water Environment Research*, *79*(12), 2437–2445.
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z. & Keller, J. (2007b). Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Research*, *41*(14), 3033–3042.
- Bock, E. & Wagner, M. (2013). *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bodelier, P. L. E., Libochant, J. A. & Blom, C. W. P. M. (1996). Dynamics of Nitrification and Denitrification in Root- Oxygenated Sediments and Adaptation of Ammonia-Oxidizing Bacteria to Low-Oxygen or Anoxic Habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(11), 4100–4107.
- Bucur, B., Icardo, C. & Martinez, J. (2006). Spectrophotometric determination of ammonium by an rFIA assembly. *Revue Roumaine de Chimie*, *51*(296), 101–108.

- Cetin, F. D. & Surucu, G. (1990). Effects of temperature en pH on the settleability of activated-sludge flocs. *Water Science and Technology*, 22(9), 249–254.
- Chagas, A. P. (2007). The ammonia synthesis: Some historical aspects. *Química Nova*, 30(1), 240–247.
- Chen, K.-C., Lee, S.-C., Chin, S.-C. & Houg, J.-Y. (1998). Simultaneous carbon-nitrogen removal in wastewater using phosphorylated PVA-immobilized microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(5), 311–320.
- Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Muñoz, C. & Antileo, C. (2006). Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. *Process Biochemistry*, 41(8), 1764–1772.
- Clippeleir, D., Courtens, E., Mosquera, M., Vlaeminck, S. E., Smets, B. F., Boon, N. & Verstraete, W. (2012). Efficient Total Nitrogen Removal in an Ammonia Gas Biofilter through High-Rate OLAND. *Environmental Science and Technology*, 46, 8826–8833.
- Coolen, M. J. L., Abbas, B., van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G. & Sinninghe Damsté, J. S. (2007). Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1001–1016.
- Courtens, E. N. P., Boon, N., De Schryver, P. & Vlaeminck, S. E. (2014). Increased salinity improves the thermotolerance of mesophilic nitrification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4691–4699.
- Courtens, E. N. P., Meerburg, F., Mausen, V. & Vlaeminck, S. E. (2014). When the smoke disappears: dealing with extinguishing chemicals in firefighting wastewater. *Water Science and Technology*, 69(8), 1720–1727.
- Courtens, E. N. P., Vlaeminck, S. E., Vilchez-Vargas, R., Verliefe, A., Jauregui, R., Pieper, D. H. & Boon, N. (2014). Trade-off between mesophilic and thermophilic denitrification: rates vs. sludge production, settleability and stability. *Water Research*, 63, 234–244.
- De la Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M. & Stahl, D. a. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 10(3), 810–818.
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G. & Sayler, G. S. (2002). Quantification of Nitrosomonas oligotropha -Like Ammonia- Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp . from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 245–253.
- Edwards, T. a, Calica, N. a, Huang, D. a, Manoharan, N., Hou, W., Huang, L., Panosyan, H., Dong, H. & Hedlund, B. P. (2013). Cultivation and characterization of thermophilic Nitrospira species from geothermal springs in the US Great Basin, China, and Armenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(2), 283–292.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W. & Bock, E. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, nitrospira-moscoviensis sp-nov and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, 164(1), 16–23.

- Entex Technologies. (2010). BioPortz moving media system.
- Erguder, T. H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M. & Verstraete, W. (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 855–869.
- Flippin, T. H. & Eckenfelder, W. W. (1994). Effects of elevated-temperature on the activated-sludge process. Portland, Oregon.
- Francis, C. a, Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E. & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14683–14688.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R. & Vo, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153–226.
- Gaouar-Yadi, M., Gaouar-Benyelles, N. & Benguella, B. (2014). Comparison between SBR, MBR and Activated Sludge Process Efficiency In Waste Water Treatment field. *International Journal of Environment & Water*, 3(5), 74–84.
- Graham, D. W., Knapp, C. W., Van Vleck, E. S., Bloor, K., Lane, T. B. & Graham, C. E. (2007). Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *The ISME Journal*, 1(5), 385–393.
- Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. & Eaton, A. D. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC, USA: American Public Health Association.
- Grunditz, C. & Dalhammar, G. (2001). Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of nitrosomonas and nitrobacter. *Water Research*, 35(2), 433–440.
- Hallam, S. J., Mincer, T. J., Schleper, C., Preston, C. M., Roberts, K., Richardson, P. M. & DeLong, E. F. (2006). Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biology*, 4(4), e95.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E. V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H. & Wagner, M. (2008). A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2134–2139.
- He, J.-Z., Shen, J.-P., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., Zheng, Y.-M., Xu, M.-G. & Di, H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2364–2374.
- Henze, M., VanLoosdrecht, M., Ekama, G. & Brdjanovic, D. (2008). Biological wastewater treatment: principles, modeling and design. London: IWA Publishing.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J. & Arciero, D. M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 71, 59–67.

- Hwang, Y. M. (2010). Aggregation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Cu / Zn Superoxide Dismutase.
- Itoh, Y., Sakagami, K., Uchino, Y., Boonmak, C., Oriyama, T., Tojo, F., Matsumoto, M. & Morikawa, M. (2013). Isolation and Characterization of a Thermotolerant Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas* sp. JPCCT2 from a Thermal Power Station. *Microbes and Environments*, 28(4), 432–435.
- Jahren, S. J., Rintala, J. a & Ødegaard, H. (2002). Aerobic moving bed biofilm reactor treating thermomechanical pulping whitewater under thermophilic conditions. *Water Research*, 36(4), 1067–1075.
- Johnson, C. H., Brinkley, J. & Souza, R. (2013). Moving bed biofilm reactor technology – a full-scale installation for treatment of pharmaceutical wastewater. *Chemical Business*, 27(3), 50–59.
- Ju, F., Guo, F., Ye, L., Xia, Y. & Zhang, T. (2014). Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. *Environmental Microbiology Reports*, 6(1), 80–89.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. & Pommerening-ro, A. (1998). Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge : *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira* -Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3042–3051.
- Ke, X., Angel, R., Lu, Y. & Conrad, R. (2013). Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil. *Environmental Microbiology*, 15(8), 2275–2292.
- Kim, H.-S., Gellner, J. W., Boltz, J. P., Freudenberg, R. G., Gunsch, C. K. & Schuler, A. J. (2010). Effects of integrated fixed film activated sludge media on activated sludge settling in biological nutrient removal systems. *Water Research*, 44(5), 1553–1561.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B. & Stahl, D. a. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543–546.
- Koops, H. & Pommerening-ro, A. (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37, 1–9.
- Koupaie, E. H., Moghaddam, M. R. A. & Hashemi, H. (2011). Comparison of overall performance between moving-bed and conventional sequencing batch. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 8(3), 235–244.
- Kowalchuk, G. A. & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55, 485–529.
- Kreft, J. U., Picioreanu, C., Wimpenny, J. W. T. & van Loosdrecht, M. C. M. (2001). Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology*, 147(11), 2897–2912.
- Krishna, C. & Van Loosdrecht, M. C. M. (1999). Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Research*, 33(10), 2374–2382.

- Kulikowksa, D., Kaczówka, E., Pokój, T. & Gusiatin, Z. (2009). Microbial communities in biomass immobilized in the porous carrier. *New Biotechnology*, 25S, S351–S352.
- Lackner, S. & Horn, H. (2013). Comparing the performance and operation stability of an SBR and MBBR for single-stage nitrification-anammox treating wastewater with high organic load. *Environmental Technology*, 34(10), 1319–1328.
- Lam, P., Jensen, M. M., Lavik, G., McGinnis, D. F., Müller, B., Schubert, C. J., Amann, R., Thamdrup, B. & Kuypers, M. M. M. (2007). Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), 7104–7109.
- Lapara, T. M. & Alleman, J. E. (1999). Review paper thermophilic aerobic biological wastewater treatment. *Water Research*, 33(4), 895–908.
- Lebedeva, E. V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock, E. & Spieck, E. (2005). Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 297–306.
- Lebedeva, E. V., Hatzenpichler, R., Pelletier, E., Schuster, N., Hauzmayer, S., Bulaev, A., Grigor'eva, N. V., Galushko, A., Schmid, M., Palatinszky, M., Le Paslier, D., Daims, H. & Wagner, M. (2013). Enrichment and genome sequence of the group I.1a ammonia-oxidizing Archaeon "Ca. Nitrosotenuis uzonensis" representing a clade globally distributed in thermal habitats. *PLoS One*, 8(11), e80835.
- Lebedeva, E. V., Off, S., Zumbrägel, S., Kruse, M., Shagzhina, A., Lücker, S., Maixner, F., Lipski, A., Daims, H. & Spieck, E. (2011). Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(2), 195–204.
- Lee, J. H. & Bang, K. W. (2000). Characterization of urban stormwater. *Water Research*, 34(6), 1773–1780.
- Lerch, R. N., Barbarick, K. A., Azari, P., Sommers, L. E. & Westfall, D. G. (1993). Sewage Sludge Proteins. *Journal of Environmental Quality*, 22(3), 620–629.
- Levstek, M. & Plazl, I. (2009). Influence of carrier type on nitrification in the moving-bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 59(5), 875–882.
- Levstek, M., Plazl, I. & Rouse, J. D. (2010). Estimation of the Specific Surface Area for a Porous Carrier. *Acta Chimica Slovenica*, 57, 45–51.
- Liao, B. Q., Lin, H. J., Langevin, S. P., Gao, W. J. & Leppard, G. G. (2011). Effects of temperature and dissolved oxygen on sludge properties and their role in bioflocculation and settling. *Water Research*, 45(2), 509–520.
- Liu, S., Yang, F., Gong, Z. & Su, Z. (2008). Assessment of the positive effect of salinity on the nitrogen removal performance and microbial composition during the start-up of CANON process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 339–348.

- Lopez-Vazquez, C. M., Kubare, M., Saroj, D. P., Chikamba, C., Schwarz, J., Daims, H. & Brdjanovic, D. (2014). Thermophilic biological nitrogen removal in industrial wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 945–956.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Bioscience Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Marks, C. R., Stevenson, B. S., Rudd, S. & Lawson, P. a. (2012). Nitrospira-dominated biofilm within a thermal artesian spring: a case for nitrification-driven primary production in a geothermal setting. *Geobiology*, 10(5), 457–466.
- Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R. & Stahl, D. a. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 461(7266), 976–9.
- McQuarrie, J. P. & Boltz, J. P. (2011). Moving bed biofilm reactor technology: process applications, design, and performance. *Water Environment Research : A Research Publication of the Water Environment Federation*, 83(6), 560–575.
- Montgomery, H. A. & Dymock, J. F. (1961). The determination of nitrite in water. *Analyst*, 86, 414–416.
- Moussa, M. S., Sumanasekera, D. U., Ibrahim, S. H., Lubberding, H. J., Hooijmans, C. M., Gijzen, H. J. & van Loosdrecht, M. C. M. (2006). Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research*, 40(7), 1377–1388.
- Nadarajah, N., Allen, D. G. & Fulthorpe, R. R. (2007). Effects of transient temperature conditions on the divergence of activated sludge bacterial community structure and function. *Water Research*, 41(12), 2563–2571.
- Olsen, B. J. S. C. & Markwell, J. (2007). Assays for Determination of Protein. *Current Protocols in Protein Science*, 1–29.
- Paul, M. J., Meyer, J. L. & Meyer, L. (2014). Streams in the urban landscape. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(2001), 333–365.
- Pearson, A., Pi, Y., Zhao, W., Li, W., Li, Y., Inskip, W., Perevalova, A., Romanek, C., Li, S. & Zhang, C. L. (2008). Factors controlling the distribution of archaeal tetraethers in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3523–3532.
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., Mcmeekin, T. A., Stokes, A. N. & Chandler, R. E. (1983). Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. *Journal of Bacteriology*, 154(3), 1222–1226.
- Rintala, J. & Lepisto, R. (1993). Thermophilic anaerobic-aerobic and aerobic treatment of kraft bleaching effluents. *Water Science and Technology*, 28(2), 11–16.
- Rotthauwe, J., Witzel, K. & Liesack, W. (1997). The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker : Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712.

- Rusten, B., Eikebrokk, B., Ulgenes, Y. & Lygren, E. (2006). Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 322–331.
- Salveti, R., Azzellino, A., Canziani, R. & Bonomo, L. (2006). Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors. *Water Research*, 40(15), 2981–2993.
- Satoh, K., Takizawa, R., Sarai, M., Sato, N., Takahashi, R. & Tokuyama, T. (2004). Two kinds of ammonia-oxidizing bacteria isolated from biologically deodorizing plants in cold district. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(3), 207–210.
- Schouten, S., van der Meer, M. T. J., Hopmans, E. C., Rijpstra, W. I. C., Reysenbach, A.-L., Ward, D. M. & Sinninghe Damsté, J. S. (2007). Archaeal and bacterial glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in hot springs of yellowstone national park. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6181–6191.
- Schramm, A., Wagner, M. & Amann, R. (1998). Identification and Activities In Situ of Nitrospira and Nitrospira spp. as Dominant Populations in a Nitrifying Fluidized Bed Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3480–3485.
- Shi, J., Wang, Z., Stiverson, J. a, Yu, Z. & Li, Y. (2013). Reactor performance and microbial community dynamics during solid-state anaerobic digestion of corn stover at mesophilic and thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 136, 574–581.
- Shimaya, C. & Hashimoto, T. (2011). Isolation and characterization of novel thermophilic nitrifying Bacillus sp. from compost. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57(1), 150–156.
- Shore, J. L., M'Coy, W. S., Gunsch, C. K. & Deshusses, M. A. (2012). Application of a moving bed biofilm reactor for tertiary ammonia treatment in high temperature industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 112, 51–60.
- Simm, R. A., Mavinic, D. S. & Ramey, W. D. (2006). A targeted study on possible free ammonia inhibition of Nitrospira. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 5(5), 365–376.
- Sin, G., Weijma, J., Spanjers, H. & Nopens, I. (2008). Dynamic model development and validation for a nitrifying moving bed biofilter: Effect of temperature and influent load on the performance. *Process Biochemistry*, 43(4), 384–397.
- Siripong, S. & Rittmann, B. E. (2007). Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 41(5), 1110–1120.
- Skerjanec, M., Levstek, M., Kompare, B. & Atanasova, N. (2009). Model based nitrification efficiency analysis of two biomass carriers. Kraków (2nd IWA specialized conference).
- Sorokin, D. Y., Lückner, S., Vejmolkova, D., Kostrikina, N. a, Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., Le Paslier, D., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht, M. C. M. & Daims, H. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *The ISME Journal*, 6(12), 2245–2256.
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D. a, Wagner, M. & Schleper, C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-

- oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in Microbiology*, 18(8), 331–340.
- Stathopoulos, P. B., Scholz, G. a, Hwang, Y.-M., Rumfeldt, J. a O., Lepock, J. R. & Meiering, E. M. (2004). Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Science*, 13(11), 3017–3027.
- Stieglmeier, M., Klingl, A., Alves, R. J. E., Rittmann, S. K.-M. R., Melcher, M., Leisch, N. & Schleper, C. (2014). Nitrososphaera viennensis gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2738–2752.
- Suvilampi, J. & Rintala, J. (2002). Comparison of activated sludge processes at different temperatures: 35 degrees C, 27-55 degrees C, and 55 degrees C. *Environmental Technology*, 23(10), 1127–1133.
- Tourna, M., Freitag, T. E., Nicol, G. W. & Prosser, J. I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1357–1364.
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H.-P. & Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7(12), 1985–1995.
- Tripathi, C. S. & Grant Allen, D. (1999). Comparison of mesophilic and thermophilic aerobic biological treatment in sequencing batch reactors treating bleached kraft pulp mill effluent. *Water Research*, 33(3), 836–846.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1999). Wastewater Technology Fact Sheet Sequencing Batch Reactors. Washington DC, USA.
- UNEP Caribbean Environment Programme. (1998). Appropriate Technology for Sewage Pollution Control in the Wider Caribbean Region. *CEP Technical Report No. 40*.
- Vadivelu, V. M., Keller, J. & Yuan, Z. (2006). Effect of Free Ammonia and Free Nitrous Acid Concentration on the Anabolic and Catabolic Processes of an Enriched Nitrosomonas Culture. *Water Research*, 41, 826–834.
- Vandecasteele, C. & Block, C. (2006). Milieuproblemen en -technologie. Leuven: LannooCampus.
- Vandekerckhove, T. (2014). Ontwikkelingsstrategieën voor thermofiele nitrificatie ter behandeling van warm afvalwater.
- Vejmelkova, D., Sorokin, D. Y., Abbas, B., Kovaleva, O. L., Kleerebezem, R., Kampschreur, M. J., Muyzer, G. & van Loosdrecht, M. C. M. (2012). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria dominating in lab-scale bioreactors with high ammonium bicarbonate loading. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 401–410.
- Vekeman, M. (2014). Stageverslag.

- Vilchez-Vargas, R., Geffers, R., Suárez-Diez, M., Conte, I., Waliczek, A., Kaser, V. S., Kralova, M., Junca, H. & Pieper, D. H. (2013). Analysis of the microbial gene landscape and transcriptome for aromatic pollutants and alkane degradation using a novel internally calibrated microarray system. *Environmental Microbiology*, *15*(4), 1016–1039.
- Vlaeminck, S. E., Terada, A., Smets, B. F., De Clippeleir, H., Schaubroeck, T., Bolca, S., Demeestere, L., Mast, J., Boon, N., Carballa, M. & Verstraete, W. (2010). Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitrification and anammox. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(3), 900–909.
- Vogelaar, J. C. T., De Keizer, A., Spijker, S. & Lettinga, G. (2005). Bioflocculation of mesophilic and thermophilic activated sludge. *Water Research*, *39*(1), 37–46.
- Vogelaar, J. C. T., Klapwijk, A., Van Lier, J. & Rulkens, W. (2000). Temperature effects on the oxygen transfer rate between 20 and 55°C. *Water Research*, *34*(3), 1037–1041.
- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms : from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(3), 263–290.
- Wiesmann, U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. Berlin: Springer-Verlag.
- Yamamoto, N., Otawa, K. & Nakai, Y. (2010). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting. *Microbial Ecology*, *60*(4), 807–815.
- Yasuda, T., Waki, M., Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Yamagishi, T., Suwa, Y. & Suzuki, K. (2013). Responses of community structure of amoA-encoding archaea and ammonia-oxidizing bacteria in ammonia biofilter with rockwool mixtures to the gradual increases in ammonium and nitrate. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(3), 746–61.
- Zafarzadeh, A., Bina, B., Nikaeen, M. & Attar, H. M. (2010). Performance of moving bed biofilm reactors for biological nitrogen compounds removal from wastewater by partial nitrification-denitrification. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, *7*(4), 353–364.
- Zhang, C. L., Ye, Q., Huang, Z., Li, W., Chen, J., Song, Z., Zhao, W., Bagwell, C., Inskeep, W. P., Ross, C., Gao, L., Wiegel, J., Romanek, C. S., Shock, E. L. & Hedlund, B. P. (2008). Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(20), 6417–6426.
- Zhang, S., Wang, Y., He, W., Wu, M., Xing, M., Yang, J., Gao, N. & Pan, M. (2014). Impacts of temperature and nitrifying community on nitrification kinetics in a moving-bed biofilm reactor treating polluted raw water. *Chemical Engineering Journal*, *236*, 242–250.
- Zhang, S., Wang, Y., He, W., Wu, M., Xing, M., Yang, J., Gao, N. & Yin, D. (2013). Responses of biofilm characteristics to variations in temperature and NH₄(+)-N loading in a moving-bed biofilm reactor treating micro-polluted raw water. *Bioresource Technology*, *131*, 365–373.