

1979-07

stora

BIBLIOTHEEK DE HAAR
Droevendaalsesteeg 30
Postbus 241
6700 AE Wageningen

Handleiding voor
microscopisch slibonderzoek

6 JAN 2004



Σ 2 14410 (79-07)

stora

postbus 80200, 2508 GE den haag, 070 - 512710 stichting toegepast onderzoek reiniging afvalwater

Handleiding voor microscopisch slibonderzoek

070 512710

	INHOUD	III-IV
	TEN GELEIDE	V
1	INLEIDING	1
2	ACTIEF-SLIB: EEN ECOSYSTEEM ONDER KUNSTMATIGE OMSTANDIGHEDEN	2-6
2.1	Het actief-slibproces	2-3
2.2	Opbouw en functie van de slibvlok	3-4
2.3	Ecologie van het actief-slib	4-5
2.4	Enkele toepassingen van het actief-slibprincipe	5-6
3	MICROSCOPIE	7-11
3.1	Basisprincipes	7-9
3.2	Helderveld en Fase-contrast	9
3.3	Prepareertechnieken	9-10
3.4	Het instellen en gebruiken van een microscoop	10-11
4	MICROSCOPISCH SLIBONDERZOEK	12-14
4.1	Het microscopisch beeld	12-14
4.2	Interpretatie van de waarnemingen	14
5	MORFOLOGIE VAN DE VLOK	15-18
5.1	Vorm en structuur van de vlok	15-16
5.2	Afmetingen van de vlok	16
5.3	Samenstelling van de vlok	17
5.4	Disperse bacteriegroei	17-18
6	LICHT SLIB	19-24
6.1	Inleiding	19-20
6.2	Zoogloea slib	20
6.3	Draadvormig slib	20-24
6.3.1	<i>Draadvormige micro-organismen</i>	20-21
6.3.2	<i>Kwantificering van de mate van draadvorming</i>	21-22
6.3.3	<i>De begrippen "dominerend" en "secundair"</i>	22-24
7	DETERMINATIE VAN DRAADVORMIGE MICRO-ORGANISMEN	25-40
7.1	Morfologische kenmerken	25-29
7.2	Kleuringstechnieken	29-31
7.2.1	<i>Kleuring volgens Gram</i>	29-30
7.2.2	<i>Neisser-kleuring</i>	30-31
7.2.3	<i>Zwavel-opslag test</i>	31
7.3	Beschrijving van de draadvormige micro-organismen	31-37
7.4	Het determinatieschema	37-40
8	PROTOZOA, ROTIFERA EN NEMATODA IN ACTIEF-SLIB	41-47
8.1	Protozoa	41-47
8.1.1	<i>Ciliata</i>	41-44
8.1.2	<i>Flagellaten</i>	44-46

8.1.3	<i>Rhizopoda</i>	46
8.1.4	<i>Actinopoda</i>	47
8.2	Nematoda	47
8.3	Rotifera	47
	LITERATUUR	48
	Bijlage 1: Analysestaat voor een microscopisch slibbeeld	49
	Bijlage 2: Analysestaat voor de determinatie van draadvormige micro-organismen in actief-slib	50
	Bijlage 3: Micro-opnamen. Plaat A t/m S.	51–87

TEN GELEIDE

Dit handboek voor het beschrijven en herkennen van micro-organismen en vlokstructuren in zuiveringsslib werd samengesteld als onderdeel van STORA-onderzoek naar voorkomen en bestrijding van licht slib. Licht slib ontstaat door massale groei van draadvormige bacteriën tijdens het zuiveringsproces. Het bezinkt slecht en beïnvloedt daardoor de kwaliteit van het gezuiverde afvalwater in ongunstige zin. Het tijdig onderkennen van een licht-slibprobleem is alleen mogelijk door geregeld microbiologisch onderzoek.

De Onderzoekadviescommissie* van de STORA hoopt met deze handleiding bovendien de microscopische analyse van zuiveringsslib in het algemeen te bevorderen.

Het onderzoek wordt uitgevoerd door het Instituut voor Milieuhygiëne en Gezondheidstechniek TNO te Delft, (projectleider ir. D.H. Eikelboom) namens de STORA begeleid door een commissie, bestaande uit: ir. R. Karper (voorzitter), ir. J.W. van Hoeve, ir. A. Kiestra, drs. F.A. Kouwe en ir. J.H. Rensink.

De directeur van de STORA
drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff

Rijswijk, 8 mei 1979

* prof. ir. A.C.J. Koot (voorzitter), drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff (secretaris) en de leden dr. ir. H.J. Eggink, prof. dr. P.G. Fohr, ir. R. Karper, ir. C.H. Kuggeleijn, ir. J.S. Kuyper, ir. Th.G. Martijn, ir. H.A. Meijer, ir. H.M.J. Scheltinga, dr. ir. D.W. Scholte Ubink, ir. J. van Selm, ir. M. Tiessens, drs. A.A. Wismeijer.

1 INLEIDING

Voor de zuivering van afvalwater wordt op grote schaal gebruik gemaakt van het actief-slib proces. Hoewel dit proces in diverse modificaties toepassing vindt zijn de basisprincipes van al deze, in de praktijk toegepaste, uitvoeringsvormen met elkaar vergelijkbaar. De actief-slibvlokken vormen de as waar het gehele proces om draait. Veel storingen zijn een rechtstreeks gevolg van het feit dat deze slibvlokken niet in een optimale conditie verkeren. Kennis van de kwaliteit van de vlok is daarom vrijwel onontbeerlijk om storingen in het zuiveringsproces op de juiste manier te interpreteren en zodoende gericht te kunnen bestrijden. Zo kan bijvoorbeeld een troebel effluent niet alleen veroorzaakt worden door het slecht bezinken van de vlokken in de nabezinktank, als gevolg van een massale groei van draadvormige micro-organismen, maar ook door te kleine vlokken, de afwezigheid van een goed protozoënbestand of door disperse bacteriegroei. Hoewel het uiteindelijk effect van al deze storingen dus met elkaar vergelijkbaar is, nl.: een troebel effluent, is toch steeds sprake van verschillende oorzaken. Het is vanzelfsprekend dat bij de uiteindelijke keuze van het soort maatregel om bepaalde storingen in het zuiveringsproces op te heffen rekening gehouden moet worden met wat er in feite aan de hand is. Een microscopische beoordeling van het slib is hierbij veelal onmisbaar, aangezien voornamelijk op deze manier informatie over de feitelijke kwaliteit van de slibvlok verkregen kan worden.

Het bepalen van een microscopisch beeld van slib is echter meestal niet in het standaard-analyseprogramma van rioolwaterzuiveringsinrichtingen (= rwzi's) opgenomen. Hiervoor zijn verschillende redenen aan te wijzen.

Het feit dat veel, van de over dit onderwerp beschikbare, informatie vrij moeilijk toegankelijk is voor de in de praktijk werkzame mensen, speelt hierbij ongetwijfeld een voorname rol. Daar komt nog bij dat in de verschillende publicaties over dit onderwerp nooit het onderwerp in zijn totaliteit behandeld wordt, maar dat een bepaald facet, b.v. het protozoënbestand in slib aan de orde gesteld wordt.

Bovenstaande overwegingen hebben geleid tot de beslissing om een slibbeoordelings-handleiding samen te stellen waarin alle beschikbare informatie betreffende de kwaliteitscontrole van slibvlokken met behulp van een microscoop opgenomen zal worden. De handleiding geeft geen compleet overzicht van alles wat over de biologie van het actief slib proces bekend is. Dit valt buiten de opzet van de handleiding. Alleen die informatie welke onmisbaar is om een microscopisch beeld op de juiste manier te kunnen interpreteren is in dit boekje opgenomen. Hierbij is er rekening mee gehouden dat *degenen die de microscopische slibanalyses in de praktijk uit zullen gaan voeren* veelal een chemische en/of technologische scholing gehad hebben en weinig weten over de biologie van het actief-slibproces.

Op de laatste pagina van deze handleiding vindt de geïnteresseerde lezer, die zich verder wil verdiepen in de biologie van het actief slib proces, een aantal titels van boeken en enkele literatuurreferenties over dit onderwerp.

2 ACTIEF-SLIB: EEN ECOSYSTEEM ONDER KUNSTMATIGE OMSTANDIGHEDEN

In het ons omringende milieu is sprake van een voortdurende productie van organische verbindingen. Talloze levensprocessen resulteren in de synthese van koolhydraten, eiwitten, vetten etc. etc. De zonne-energie is de drijvende kracht bij deze syntheseprocessen. Planten (inclusief algen) kunnen deze energie benutten voor de productie van hun celmateriaal. De hiervoor benodigde mineralen (C, H, N, O, P, S etc.) worden onttrokken aan het omringende milieu. Het gevormde celmateriaal kan vervolgens als voedsel dienen voor dieren etc., welke op hun beurt soms ook weer door andere organismen geconsumeerd worden. Planten en dieren gaan echter op een gegeven moment dood, waarna de bacteriën hun actieve bijdrage aan de kringloop gaan leveren door het gehele scala aan organische verbindingen weer af te breken. De bij dit mineralisatieproces gevormde anorganische componenten worden vervolgens weer door de fotosynthetische organismen gebruikt. Hiermee is de kringloop gesloten.

De micro-organismen (bacteriën en schimmels in het bijzonder) zijn dus al van 'nature' actief betrokken bij de afbraak van organisch materiaal. Zij doen dit omdat zij het dode organische materiaal uitstekend kunnen gebruiken. De beschikbare organische verbindingen worden ten dele afgebroken. De energie die hierbij vrijkomt wordt benut om het resterende deel om te zetten in nieuw celmateriaal.

In rioolwater zijn te weinig micro-organismen aanwezig om deze afbraak van organische verbindingen snel en efficiënt te laten verlopen. Het actief-slibproces ondervangt dit bezwaar.

2.1 Het actief-slibproces

Wanneer rioolwater belucht wordt, dan vormen zich na verloop van tijd spontaan vlokken bacteriemateriaal. Wordt de beluchting stop gezet dan bezinken de vlokken.

De bovenstaande vloeistof, waarvan de verontreinigingsgraad aanzienlijk gedaald is, kan afgelaten worden. De vlokken kunnen gebruikt worden om een nieuwe portie rioolwater te zuiveren. Op deze ontdekking is het actief-slibproces gebaseerd.

Wat is er nu eigenlijk gebeurd in het beluchte rioolwater? Aan het rioolwater, waarin van nature al veel bacteriën aanwezig zijn, is zuurstof toegevoerd. De verschillende bacteriën groeien snel en delen zich regelmatig. De totale biomassa ($= M$) neemt toe tot de beschikbare voedingsstoffen uitgeput raken. De concentratie van de aanwezige voedingsstoffen ($= F$) daalt tijdens de beluchting omdat de organische verbindingen gedeeltelijk afgebroken worden, waarna het resterende deel omgezet wordt in nieuw celmateriaal. Tijdens de beluchtingsfase daalt de F/M -verhouding dus voortdurend. Op het tijdstip nul waren in het rioolwater hooguit enkele mg/l biomassa aanwezig, terwijl de concentratie van de voedingsstoffen 500-1000 mg/l was. In het begin is de F/M -verhouding dus hoog. De bacteriecellen zijn dan nog dispers verdeeld in de vloeistof aanwezig. Tijdens de groei verandert de F/M -verhouding snel. Zowel de toename van M als de afname van F verloopt logaritmisch. Is de F/M -verhouding op een voldoende laag niveau beland, dan gaan de cellen agglomeraten vormen: de zogenaamde actief-slibvlokken.

In zuiveringsinrichtingen worden deze vlokken vervolgens via een bezinkingsproces gescheiden van het effluent. De bezonken biomassa wordt gedeeltelijk teruggevoerd naar de aëratieruimte, waardoor hierin een lage F/M -verhouding gehandhaafd blijft. Dit is niet

alleen bevorderlijk voor de vlokvorming maar ook voor de snelheid waarmee het zuiveringsproces verloopt. De overproduktie aan bacteriemateriaal wordt als surplus slib afgevoerd.

Tijdens het zuiveringsproces wordt voortdurend nieuw celmateriaal gevormd. Een groot deel, soms wel 60–70%, van de met het rioolwater aangevoerde organische verbindingen wordt niet afgebroken maar omgezet in celmateriaal. Dit betreft niet alleen nieuwe cellen, maar ook de produktie van reservevoedsel door de bacteriën uit de vlok. Voor deze synthese van celmateriaal worden de beschikbare organische verbindingen uit het rioolwater benut. Daarnaast worden ook anorganische verbindingen vastgelegd in nieuw celmateriaal. In tegenstelling tot de organische verbindingen worden de anorganische verbindingen tijdens het zuiveringsproces slechts gedeeltelijk verwijderd. Voor de opbouw van zijn celmateriaal heeft de bacterie C, N, P, H, O, S, etc. in bepaalde hoeveelheden nodig. In normaal stedelijk afvalwater is de hoeveelheid beschikbare koolstof de beperkende groeifactor. Dit heeft als consequentie dat de aangevoerde C-verbindingen vrijwel volledig verwijderd worden tijdens het zuiveringsproces. De overige verbindingen welke namelijk in overmaat aanwezig zijn, vinden we voor een belangrijk gedeelte weer terug in het effluent.

2.2 Opbouw en functie van de slibvlok

In een actief-slibinrichting vormen de slibvlokken de as waar het zuiveringsproces om draait. Waaruit bestaan nu deze vlokken? Dit is niet zo eenvoudig te beantwoorden. Zeer globaal kan gesteld worden dat in een vlok aanwezig zullen zijn:

- levende micro-organismen; hoofdzakelijk bacteriën.
- afgestorven cellen.
- onverteerde grote organische brokstukken, welke "ingevangen" zijn door de vlok.
- een anorganische fractie; o.a. het zand dat met het rioolwater aangevoerd wordt. De grootte van deze fractie kan variëren van 10–50 (gewichts) %.

Hoe de vlok in bepaalde zuiveringsinrichtingen in feite samengesteld is hangt af van de situatie ter plaatse. De kwaliteit van het aangevoerde rioolwater speelt natuurlijk een belangrijke rol. Zijn alle benodigde voedingsstoffen wel in voldoende mate aanwezig? In sommige industriële afvalwaters is b.v. vaak te weinig N en/of P aanwezig. Veel bacteriën worden dan geremd in hun groei. Het zuiveringsproces verloopt minder volledig en er wordt een slib geproduceerd dat veel slijmstoffen bevat waardoor het moeilijk te ontwateren is. De aanwezigheid van een zandvang en/of voorbezinkingstank is beslissend over de mate waarin grotere (an)organische deeltjes in de beluchtingsruimte terechtkomen. Daarnaast heeft ook de belasting van de rioolwaterzuiveringsinrichting (rwzi) een heel belangrijke invloed op de samenstelling van de vlok.

In hoogbelaste rwzi's zal het percentage levende cellen in het slib groter zijn dan in slibben afkomstig uit laagbelaste oxydatiesloten.

Wanneer afvalwater belucht wordt dan vormen zich spontaan vlokken. Een lage F/M-verhouding is de voornaamste voorwaarde waaraan voldaan moet worden. Waarom zich vlokken vormen is echter vooralsnog een gedeeltelijk onverklaarbaar fenomeen. Van een aantal factoren is bekend dat ze een rol spelen bij het ontstaan van actief slib vlokken, nl.:

- Veel bacteriën vormen slijmkapsels. Het slijm, dat hoofdzakelijk uit polymere verbindingen is opgebouwd, kit de cellen als het ware aan elkaar.

- Bacteriën zijn negatief geladen. Positief geladen ionen afkomstig van anorganische verbindingen dragen bij tot de koppeling van de cellen.
- Sommige bacteriën vormen om de cel heen een netwerk van uiterst dunne draadjes (fibrillen). Deze zijn meestal opgebouwd uit cellulose of een ander polysaccharide. Ook dit netwerk kan bijdragen tot de koppeling van cellen en het invangen van andere bacteriën.

Het actief-slibprocédé is in principe een aëroob zuiveringsproces. Dit betekent dat de micro-organismen die de aangevoerde organische verbindingen afbreken zuurstof nodig hebben om deze omzettingprocessen uit te kunnen voeren. Het slib-water mengsel wordt belucht om de benodigde zuurstof te leveren. De bacteriën aan de rand van de slibvlok kunnen de zuurstof direct uit de waterfase opnemen. De organismen uit het centrum van de vlok zijn daarentegen aangewezen op de zuurstof welke door diffusieprocessen vanuit de waterfase aangevoerd wordt. Vooral in de wat grotere vlokken is de op deze manier aangevoerde zuurstof ontoereikend om het centrum van de vlok aëroob te houden. Dit heeft als consequentie dat zich hier zogenaamde anaërobe processen gaan afspelen. Hierbij speelt moleculaire zuurstof een rol meer. In de meeste rwzi's wordt op deze manier een gedeelte van de beschikbare nitraten omgezet in N_2 -gas.

Het merendeel van de aangevoerde verbindingen kan niet direct door de cellen uit de vlok worden opgenomen. In principe kunnen alleen opgeloste, niet polymere, moleculen de celwand passeren. De overige verbindingen moeten eerst met behulp van door de organismen uitgescheiden enzymen, buiten de cel verkleind worden. Hiervoor is een bepaalde tijd nodig. De verwijdering van de in het rioolwater aanwezige verbindingen verloopt sneller dan de snelheid van opname door bacteriecellen. Dit komt doordat sorptieprocessen een belangrijke rol spelen bij het zuiveringsproces. Het merendeel van de aangevoerde verbindingen wordt niet direct opgenomen maar in eerste instantie geabsorbeerd aan de vlok. Daarna worden ze verkleind en opgenomen door de cel.

2.3 Ecologie van het actief-slib

In een rwzi worden een groot aantal verschillende (an)organische verbindingen in contact gebracht met een misschien wel even grote verscheidenheid aan micro-organismen. De in het influent aanwezige verbindingen worden door de organismen in de zuiveringsinrichting benut voor hun energielevering en celsynthese.

Nu is het niet zo dat een bepaalde verbinding zomaar door ieder organisme gebruikt kan worden. Wat dit betreft is er duidelijk sprake van grote verschillen. Sommige micro-organismen zijn typische "alleseters", andere bacteriën daarentegen zijn juist erg gespecialiseerd. De kwaliteit van een influent heeft dan ook grote invloed op de slibpopulatie. In rwzi's bij zuivelfabrieken b.v. hebben we te maken met andere organismen dan in rwzi's met een stedelijk influent.

In het algemeen kan gesteld worden dat er sprake is van een sterke competitie tussen de verschillende micro-organismen om de beschikbare voedingsstoffen. De samenstelling van de vlok is afhankelijk van de uitkomst van deze concurrentieslag.

De feitelijke groeisnelheid van de verschillende soorten micro-organismen is, naast de kwaliteit van het influent, voornamelijk bepalend voor de mate waarin de verschillende typen vertegenwoordigd zijn in de vlokpopulatie. De groeisnelheden van verschillende organismen zijn namelijk meestal niet gelijk, maar vertonen daarentegen juist vrij grote verschillen. Daar komt nog bij dat de groeisnelheid van één bepaalde bacteriestam ook niet

altijd even groot is. In feite wordt de snelheid waarmee de cellen zich delen bepaald door de omstandigheden in het milieu waarin het organisme verkeert. De O_2 -voorziening, de pH, de kwaliteit en kwantiteit van de beschikbare voedingsstoffen, de temperatuur etc. hebben allemaal invloed op de groeisnelheid. Alleen onder optimale omstandigheden bereikt de groeisnelheid van een bepaalde bacteriestam zijn maximale waarde. In een rioolwaterzuiveringsinrichting geldt voor de meeste bacteriën dat de feitelijke groeisnelheid duidelijk lager is dan de maximaal mogelijke delingssnelheid.

In een actief-slibstelsel hebben we te maken met een bacteriepopulatie welke schijnbaar in evenwicht is, maar waarin in werkelijkheid sprake is van voortdurende veranderingen. In het totale zuiveringsresultaat is dit meestal niet merkbaar. Dit is ook logisch, aangezien de veranderingen in de slibpopulatie juist gericht zullen zijn op een zo optimaal mogelijk benutten van de aangeboden voedingsstoffen, c.q. het opnemen van de in het rioolwater aanwezige producten. Het betrekkelijk stabiele karakter van het actief-slibproces heeft hier rechtstreeks mee te maken. De populatie zal zich voortdurend – hoewel ook hierbij natuurlijk sprake is van bepaalde grenzen – aanpassen aan veranderingen in de procesvoering, kwaliteit influent, seizoensinvloeden etc.

In een zuiveringsinrichting wordt het slibgehalte op een bepaald niveau gehouden door middel van het verwijderen van de slibaanwas, het zogenaamde surplus-slib. Na het bovenstaande zal het duidelijk zijn dat dit een vrij forse ingreep betekent op de processen welke de evenwichtssituatie in de zuiveringsinrichting reguleren. In concreto heeft dit namelijk als consequentie dat de organismen met een hoge delingssnelheid bevoordeeld worden boven de langzamere groeiers. Alle soorten waarvan de delingstijd de slibleeftijd overschrijdt zullen namelijk met het surplus-slib afgevoerd worden. In hoogbelaste zuiveringsinrichtingen is de diversiteit aan organismen in de vlok dan ook duidelijk kleiner dan in bijvoorbeeld oxydatiesloten. In hoeverre dit invloed heeft op het zuiveringsrendement is niet helemaal duidelijk.

Sommige verbindingen worden waarschijnlijk in hoger belaste systemen niet of onvolledig afgebroken omdat de organismen welke dit uit zouden moeten voeren zich niet in het systeem kunnen handhaven. Het ontbreken van een nitrificerende flora, welke de oxydatie van ammoniak uitvoert, in systemen waarin de slibleeftijd korter is dan 3–5 dagen, is hier een voorbeeld van.

De bacteriën en schimmels, hoewel de laatsten geen grote rol spelen bij het zuiveringsproces, groeien op de aangeboden organische verbindingen. Zij kunnen op hun beurt echter weer geconsumeerd worden door hogere organismen. In dit verband moeten de protozoën en, in mindere mate, rotiferen en nematoden genoemd worden. Deze organismen kunnen een wezenlijke bijdrage leveren aan het zuiveringsproces doordat zij veel niet-vlokgebonden bacteriecellen consumeren. Hun aantal is in het algemeen nogal aan schommelingen onderhevig.

2.4 Enkele toepassingen van het actief-slibprincipe

De bekendste uitvoeringsvormen van het actief-slib proces zijn de oxydatiesloot en het zogenaamde conventionele actief-slibstelsel (= A.T.). Bij het laatste type kunnen nog weer twee modificaties onderscheiden worden. Tabel 1 geeft een overzicht van de voornaamste verschillen tussen deze 3 systemen.

Met uitzondering van de aanwezigheid van een voorbezinktank zijn alle overige verschillen direct terug te voeren op verschillen in de belasting (= F/M-verhouding).

	oxydatiesloot	conventioneel actief-slib	
		laag belast	hoog belast
voorbezinktank BZV-belasting ¹⁾	afwezig 0,05	aanwezig 0,1-0,4	aanwezig >0,5
beluchtingstijd (uren)	60-72	5-8	< 4
nitrificatie	>90%	gedeeltelijk tot volledig	afwezig
slibleeftijd	4-12 weken	>5 dagen	3-5 dagen
slibstabilisatie	aëroob	anaëroob	anaëroob

¹⁾ In kg BZV/kg droge stof · dag.

Tabel 1. Overzicht van de belangrijkste verschillen tussen een drietal actief-slibsystemen.

In een oxydatiesloot is de belasting erg laag. Dit heeft tot gevolg dat de hoeveelheid beschikbare voedingsstoffen voor de micro-organismen erg gering zal zijn. Er is daarom sprake van een lage groeisnelheid; c.q. een hoge slibleeftijd. Hierdoor kunnen ook langzaam groeiende organismen, b.v. nitrificerende bacteriën, zich in dit zuiveringssysteem handhaven. Een lage F/M-verhouding gaat gepaard met een stevige vlokstructuur. Het aantal losse cellen (die aanwezig zijn in de vloeistof tussen de vlokken) is vrijwel altijd zeer beperkt. Het slib wordt aëroob gestabiliseerd. Hier wordt mee bedoeld dat een groot gedeelte van de opgeslagen en gevormde verbindingen (reservestoffen; inhoud van dode cellen etc.) al tijdens de beluchtingsperiode afgebroken wordt. Het ademhalingsniveau van het slib is, door het ontbreken van voldoende voedingsstoffen, erg laag.

In een A.T. wordt met een hogere F/M-verhouding gewerkt. Dit resulteert in een hogere groeisnelheid; tevens bevat het slib meer levende cellen. In een laagbelaste A.T. kan nog wel nitrificatie optreden, maar zodra de slibleeftijd korter wordt dan 3-5 dagen stopt de oxydatie van ammonium. De nitrificerende bacteriën groeien zo langzaam dat zij zich alleen in rwzi's met een hogere slibleeftijd kunnen handhaven. Vooral in hoogbelaste A.T.'s zijn in de vloeistof tussen de vlokken vaak veel losse cellen aanwezig. Kennelijk zijn in deze vloeistof nog voldoende voedingsstoffen aanwezig om deze groei mogelijk te maken. Het ademhalingsniveau van slib uit een A.T. is hoog doordat de cellen nog veel verbindingen bevatten welke snel afbreekbaar zijn. Daarom moet het surplusslib uit een A.T. nog apart gestabiliseerd worden. Meestal gebeurt dit anaëroob in een slibgisting.

3 MICROSCOPIE

Het menselijk oog is niet in staat om voorwerpen met een diameter kleiner dan 0,1 mm duidelijk te onderscheiden. Bacteriën hebben een diameter van circa 0,001 mm ($1\text{ }\mu\text{m} = 1\text{ micrometer}$) en kunnen daarom alleen met behulp van een microscoop waargenomen worden.

3.1 Basisprincipes

De maximale vergroting welke met een bepaald type microscoop bereikt kan worden is in de eerste plaats afhankelijk van het zogenaamde "oplossend vermogen". Hier wordt onder verstaan: het vermogen om 2, naast elkaar gelegen, punten nog van elkaar te kunnen onderscheiden. Anders geformuleerd: De kleinste diameter welke nog scherp waargenomen kan worden.

Het oplossend vermogen van een microscoop wordt bepaald door de golflengte van de toegepaste straling (b.v. licht) en de zogenaamde numerieke apertuur (NA) van het objectief. Dit verband kan in de volgende formule uitgedrukt worden:

$$\text{oplossend vermogen} = \frac{\text{golflengte straling}}{2 \times \text{NA}}$$

In de numerieke apertuur zijn o.a. de brekingsindex en de dikte van de laag tussen het te bestuderen object en de objectief-lens verwerkt. De golflengte van zichtbaar licht ligt tussen 0,4 en 0,7 μm . Wanneer we uitgaan van een golflengte van 0,5 μm en een $\text{NA} = 1,25$ (maximaal realiseerbare waarde) dan kunnen we berekenen dat:

$$\text{oplossend vermogen} = \frac{0,5}{2 \times 1,25} = 0,2\text{ }\mu\text{m}$$

Met een normale lichtmicroscoop kunnen dus alleen deeltjes, of onderdelen hiervan, waargenomen worden waarvan de diameter groter is dan circa 0,2 μm .

In een elektronenmicroscoop wordt niet gewerkt met zichtbaar licht maar met elektronenstraling. Aangezien de golflengte van deze straling veel kleiner is dan van zichtbaar licht is het oplossend vermogen van een elektronenmicroscoop ook veel groter. Deze bedraagt circa 0,001 μm . In het kader van deze handleiding laten we dit type microscoop echter verder buiten beschouwing.

Een normale lichtmicroscoop (figuur 1, p. 8), bestaat uit:

- een statief.
- een objecttafel; hierop rust het preparaat.
- een revolver; dit is de houder van de objectieven.
- een aantal objectieven.
- één of twee oculairen; afhankelijk van de uitvoering.
- een condensor; deze bundelt de stralen vanuit de lichtbron en concentreert deze op het te onderzoeken preparaat.
- een lichtbron; soms is deze in de voet van het statief ingebouwd; bij andere typen wordt gewerkt met een losse lichtbron in combinatie met een spiegel.

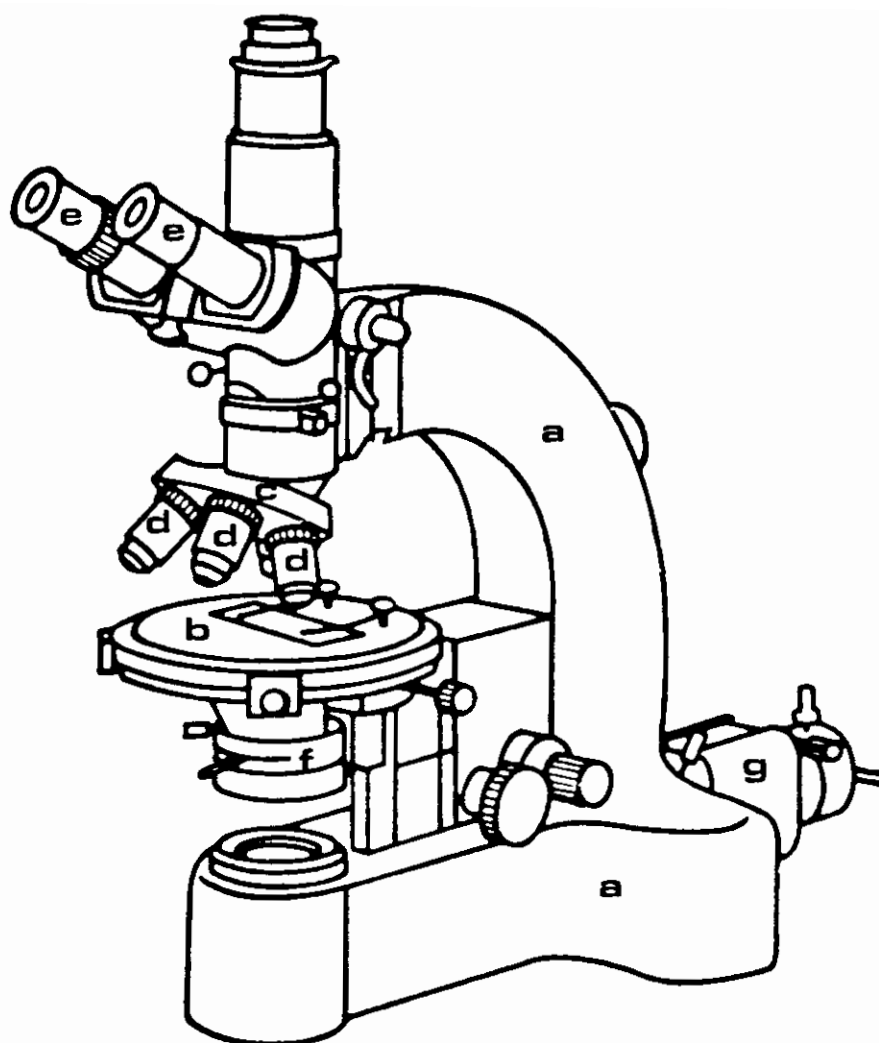


Fig. 1. **Schematische voorstelling van een microscoop**

- | | |
|----------------|--------------|
| a: statief | e: oculairen |
| b: objecttafel | f: condensor |
| c: revolver | g: lichtbron |
| d: objectieven | |

Dit type microscoop is een zogenaamde samengestelde microscoop. Het vergroten van het te bestuderen object wordt uitgevoerd met een tweetal lens-systemen, nl. een objectief en het oculair. De eindvergroting is gelijk aan het produkt van de vergroting van iedere lens afzonderlijk. Meestal wordt een 10 x oculair gebruikt; soms echter ook oculairen met een vergroting van 6, 15 of 20 x. De meeste laboratoriummicroscopen zijn uitgerust met 3-4 objectieven. Hoewel ook andere objectieven in de handel zijn wordt meestal gewerkt met objectieven welke het beeld 10, 40 of 50, resp. 100 maal vergroten. Dit resulteert dus in een totale vergroting (bij gebruik van een 10 x oculair) van 100, 400 of 500, resp. 1000 x. De keuze van het soort objectief is afhankelijk van de grootte van het te bestuderen object (zie ook paragraaf 4.1, pp. 12-14).

Bij de hogere vergrotingen (het 100 x, en soms ook het 50 x, objectief) moet de ruimte tussen de onderkant van het objectief en het dekglas van het preparaat opgevuld worden met zogenaamde immersieolie. Dit is olie met dezelfde brekingsindex (nl. 1,52) als het glas van de lenzen en het preparaat. Op deze manier worden de lichtstralen op het grensvlakglas/lucht niet afgebogen maar kunnen deze juist ongehinderd passeren.

3.2 Helderveld en Fase-contrast

Wanneer licht een medium passeert dat niet uniform van samenstelling is, b.v. een waterdruppeltje met slibvlokjes, dan zal een gedeelte van de doorvallende lichtstralen meer afgebogen of verstrooid worden dan het resterende deel. Dit is een rechtstreeks gevolg van verschillen in brekingsindices (van de waterfase en de aanwezige deeltjes of onderdelen hiervan). Deze, uiterst geringe, verschillen in brekingsindex kunnen met behulp van een normale helderveld microscoop echter nauwelijks waargenomen worden. Dit heeft als consequentie dat helderveld minder geschikt is om contrastarme preparaten te bekijken. Deze optiek (hiermee wordt bedoeld: objectief + bijpassende condensor) wordt tegenwoordig dan ook nog voornamelijk gebruikt om micro-organismen te bestuderen welke vrij *contrastrijk* zijn; b.v. organismen met een erg duidelijke structuur, een karakteristieke kleur, gekleurde preparaten etc. Voor het bekijken van de organismen uit actief slibvlokken is deze helderveld optiek echter niet ideaal. Een microscoop welke voorzien is van een zogenaamde fase-contrast uitrusting verdient voor dit doel duidelijk de voorkeur. De fase-contrast optiek "vertaalt" betrekkelijk kleine verschillen in brekingsindices in duidelijk waarneembare verschillen in helderheid. Hierdoor is deze uitrusting bij uitstek geschikt om betrekkelijk contrastarme organismen als bacteriën te bekijken. Ook de structuur in de cellen van micro-organismen kan met behulp van fasecontrast veel duidelijker waargenomen worden.

3.3 Prepareertechnieken

Voor het maken van een preparaat kan men kiezen uit verschillende mogelijkheden. De, in het kader van deze handleiding, van belang zijnde mogelijkheden zullen achtereenvolgens besproken worden.

Waterpreparaat. Van het te bestuderen materiaal, b.v. actief-slib, wordt een druppeltje op een zogenaamd voorwerpglasje gebracht. Dit voorwerpglasje moet schoon en goed ontvet zijn. Vervolgens wordt een schoon dekglasje op het druppeltje gelegd. Het insluiten van luchtbelletjes moet zoveel mogelijk voorkomen worden. Het preparaat is nu klaar en kan bekeken worden. Indien een olie-immersie objectief gebruikt wordt moet op het dekglasje eerst nog een druppeltje immersie-olie gebracht worden.

Het is belangrijk dat het opgebrachte waterdruppeltje niet te groot, maar ook niet te klein is. In het laatste geval is onvoldoende vloeistof aanwezig om de ruimte onder het dekglasje helemaal op te vullen waardoor veel luchtbelletjes ingesloten zullen worden. Het indrogen van het preparaat, als gevolg van verdamping langs de randen van het dekglasje, verloopt dan erg snel. Dit veroorzaakt sterke vloeistofstromingen in het preparaat waardoor dit moeilijk te bestuderen is. Is daarentegen de waterdruppel te groot, dan wordt de waterlaag tussen voorwerp- en dekglasje te dik. Niet alleen krijgt men dan problemen met de dieptescherpte in het preparaat maar bovendien blijft het dekglasje dan als het ware drijven op de waterdruppel. Bij gebruik van de olie-immersielens levert dit problemen op omdat het dekglasje de neiging vertoont om te verschuiven indien het

preparaat verdraaid wordt. Dit is niet alleen erg vermoeiend voor de ogen maar verstoort bovendien het preparaat. Het opbrengen van een waterdruppeltje van de juiste grootte kan het beste gerealiseerd worden m.b.v. een pipet met een kleine uitstroomopening (b.v. een pasteurse pipet) of met een zogenaamde öse (diameter opening circa 4 mm) of omgebogen entnaald. Eventueel teveel opgebrachte vloeistof kan d.m.v. het plaatsen van een filtreerpapiertje tegen de randen van het dekglas verwijderd worden.

De waterlaag tussen dek- en voorwerpglaasje moet overal even dik zijn. Indien het waterdruppeltje echter deeltjes bevat met een stevige structuur, dan kunnen deze dit verhinderen en zo problemen opleveren bij het maken van een goed preparaat. Zo zijn in slibvlokjes soms zandkorreltjes aanwezig, waarvan de diameter groter is dan de gewenste dikte van de waterlaag. Het dekglasje blijft hier dan als het ware op rusten. Eén en ander blijkt dan uit het feit dat het niet mogelijk is om de ruimte tussen de beide glaasjes helemaal op te vullen met water; aan een bepaalde kant blijft lucht aanwezig. In zo'n geval kan men beter een nieuw preparaat maken.

Droogpreparaat. Voor het maken van kleuringen etc. (zie paragraaf 7.2) wordt meestal met een zogenaamd droogpreparaat gewerkt. Een druppeltje slib suspensie wordt op een voorwerpglaasje gebracht en uitgestreken over een oppervlak van circa 1 cm². Het preparaat wordt vervolgens aan de lucht gedroogd en gefixeerd door het glaasje even met de onderkant door de spaarvlam van een bunsenbrander te halen. Hierna kan de uiteindelijke behandeling, b.v. een kleuring, uitgevoerd worden.

Telkamer. Soms wil men weten hoeveel exemplaren van een bepaald organisme in een slibmonster aanwezig zijn. Indien dit een micro-organisme betreft met duidelijk waarneembare kenmerken, b.v. protozoën, dan is het mogelijk om dit aantal te bepalen d.m.v. een telling in een microscopisch preparaat. In zo'n geval is het echter nodig dat het volume van het monster waarin de telling uitgevoerd wordt bekend is. In een gewoon waterpreparaat is wel het oppervlak van het preparaat maar niet de hoogte van de waterkolom tussen dek- en voorwerpglaasje bekend, zodat het volume niet bepaald kan worden. Een zogenaamd telkamertje is daarentegen zodanig uitgevoerd dat de hoogte constant is.

3.4 Het instellen en gebruiken van een microscoop

De kwaliteit van het microscopisch beeld wordt voor een belangrijk deel bepaald door het feit of de microscoop wel optimaal ingesteld is. Vooral bij het toepassen van een fase-contrast optiek luistert dit erg nauw. Zonder hier nu al te uitvoerig op in te gaan – de manier waarop een microscoop ingesteld moet worden is sterk afhankelijk van het merk, en kan daarom beter door de leverancier uitgelegd worden – zullen toch een aantal veel gemaakte fouten achtereenvolgens gememoreerd worden.

- De condensor dient om het licht in het preparaat te concentreren. Indien deze niet goed ingesteld is dan heeft dit niet alleen een lagere lichtopbrengst tot gevolg, maar ook een kwalitatief minder scherp beeld. De condensorinstelling moet daarom bij iedere nieuwe vergroting opnieuw gecontroleerd worden. In feite is deze handeling erg eenvoudig. Na het bijna sluiten van het diafragma wordt die condensorinstelling gezocht waarbij de diameter van de verlichte cirkel, zoals die in de microscoop waargenomen wordt, minimaal is.

- Ook voor de fase-instelling geldt dat deze regelmatig gecontroleerd moet worden. Niet alleen moet met behulp van het zogenaamde insteloculair zo nu en dan nagegaan worden of de fase-ringen nog wel concentrisch ten opzichte van elkaar staan, maar ook moet erop gelet worden of de stand van de condensor en het gebruikte objectief wel met elkaar corresponderen.
- Bij sommige microscopen is de lichtbron niet in de voet van het statief ingebouwd, maar wordt gewerkt met een los van de microscoop opgestelde lamp. Voor een optimale beeldkwaliteit is het echter noodzakelijk dat het licht op de spiegel in de voet van de microscoop geconcentreerd wordt. Het los opstellen van de lichtbron brengt met zich mee, dat regelmatig gecontroleerd moet worden of de microscoop en de lamp niet ten opzichte van elkaar verschoven zijn.
- Objectieven en oculairen moeten regelmatig goed schoongemaakt worden. Het gebruik van het speciaal voor dit doel gemaakte lenspapier verdient de voorkeur boven papieren zakdoekjes etc., aangezien laatstgenoemde producten vaak pluisjes achterlaten. Daarnaast is het zonder meer zinvol om een microscoop éénmaal per jaar een algemene servicebeurt te laten geven.
- In de druppeltjes immersie-olie op het dekglasje mogen geen luchtbelletjes aanwezig zijn. Zo'n luchtbelletje heeft een andere brekingsindex dan de olie en verstoot zo de stralengang en daardoor de helderheid en scherpte van het microscopisch beeld.
- Het vinden van het microscopisch beeld levert, vooral voor iemand die niet dagelijks met een microscoop werkt, vaak nogal wat problemen op. Deze moeilijkheid doet zich vooral voor indien bij hogere vergrotingen gewerkt wordt. De ruimte tussen de onderkant van het objectief en het oppervlak van het dekglas (de zogenaamde werkafstand) is dan erg gering. Bij een 100 x objectief bedraagt deze circa 0,15 mm. Het risico dat bij het zoeken van het beeld het objectief iets te ver omlaag gedraaid wordt, is reëel aanwezig. Het objectief raakt dan de bovenkant van het preparaat en kan daardoor beschadigd worden. Eén en ander kan voorkomen worden door in eerste instantie niet in de tubus te kijken bij het naar elkaar toe draaien van preparaat en objectief, maar in plaats hiervan deze beiden op het oog zo dicht mogelijk bij elkaar te brengen. Daarna pas in de tubus kijken en, door het preparaat te verdraaien, een herkenbaar punt (b.v. een slibvlok) opzoeken, waarna met de fijninstelling dit beeld in focus gebracht kan worden.

4 MICROSCOPISCH SLIBONDERZOEK

Een microscoop is een zeer nuttig hulpmiddel bij het verzamelen van informatie over de kwaliteit van de biomassa in een zuiveringsinrichting. Het is echter ook niet meer dan dat. Het microscopisch beeld levert uiteindelijk voornamelijk informatie over een aantal visueel waarneembare eigenschappen van het betreffende slib. De activiteit van de biomassa moet op andere manieren bepaald worden.

Bij het bepalen van een microscopisch beeld moet in principe met zo vers mogelijk slib gewerkt worden. Sommige slibeigenschappen veranderen vrij snel tijdens het bewaren van de monsters. Dit geldt vooral voor slibben afkomstig uit hoogbelaste zuiveringssystemen. Monsters actief-slib welke niet direct onderzocht kunnen worden moeten bij 4–7°C bewaard worden. Invriezen is ongewenst omdat hierdoor de structuur van de vlok aangetast wordt. Slibben uit hoogbelaste systemen kunnen op deze manier 2–4 dagen bewaard worden voordat de vlokeigenschappen sterk gaan veranderen. Voor slibben afkomstig uit oxydatiesloten geldt dat een opslagperiode van circa één week (in een koelkast; flessen voor ongeveer 1/3 gevuld met slib) toegestaan is.

Het onderzoek wordt uitgevoerd met slib dat afkomstig is uit de aëratieruimte van de rwzi, zonder dat er sprake is geweest van indikken of een andere behandeling. Het is zinvol om het te onderzoeken monster altijd op dezelfde plaats te nemen, b.v. bij de overstort naar de nabezinktank.

4.1 Het microscopisch beeld

Voor een niet getraind oog ziet elke actief-slibvlok er door een microscoop uit als een vrijwel structuurloos, sterk heterogeen samengesteld en onregelmatig gevormd conglomeraat. Zo hier en daar zijn deeltjes waarneembaar die zich verplaatsen, terwijl tussen de vlokken soms draderige structuren aanwezig zijn. De kleur van de vlokbestanddelen kan variëren van grijsgeel tot bruinzwart.

Een meer ervaren waarnemer zal echter opmerken dat niet alle vlokken er hetzelfde uitzien, maar dat er sprake is van duidelijk waarneembare verschillen. Deze, visueel waarneembare, verschillen hebben dan betrekking op:

- *vorm, structuur en afmetingen van de vlok.*
- *samenstelling van de vlok.* Is er sprake van een duidelijk waarneembare variatie van micro-organismen, zijn karakteristieke bacteriegroepen aan- of afwezig; zijn in de vlokken veel (an)organische, niet-levende deeltjes aanwezig?
- *draadvormige micro-organismen.* Zijn deze organismen in het slib aanwezig; welke soorten kunnen onderscheiden worden?
- *niet-vlokgebonden bacteriën.* Is vrijwel al het celmateriaal in de vorm van slibvlokken aanwezig of is er ook sprake van veel losse bacteriecellen tussen de vlokken?
- *hogere organismen.* Welke protozoën etc. zijn in het slib aanwezig en in welke aantallen?

Over al deze slibkarakteristieken kan met behulp van een normale fase-contrast microscoop informatie verzameld worden.

Een belangrijk punt hierbij is de vergroting welke toegepast wordt. Deze moet aangepast zijn aan de grootte van het object dat men wil bestuderen. Het heeft weinig zin een deeltje met een doorsnede van circa 1 μm te bekijken bij een vergroting van 100 x, aangezien het dan nog maar 0,1 mm dik is en dus nauwelijks waarneembaar. De onderstaande combinaties zijn een richtlijn bij de keuze van de toe te passen vergrotingen.

vergroting	object
100–200 x	vorm en afmeting van slibvlokken, protozoën en draadvormige organismen.
400–500 x	samenstelling en interne structuur van slibvlokken; identificatie van draadvormige organismen en protozoën.
800–1000 x	identificatie draadvormige organismen.

Het vastleggen van de waarnemingen vormt een essentieel onderdeel van het microscopisch onderzoek. Hierbij doen zich echter een aantal problemen voor. De uitkomst van b.v. een chemische analyse kan in een getal uitgedrukt worden, b.v. de concentratie van een bepaalde verbinding. Op deze manier is een bepaalde situatie afdoende vastgelegd en ook voor anderen te begrijpen.

De waarnemingen van een microscopische slibanalyse kunnen echter in het algemeen niet zomaar in exacte getallen vertaald worden. Het is in theorie weliswaar mogelijk om alles wat men waarneemt door middel van tellen en meten vast te leggen, maar deze procedure is vrijwel onuitvoerbaar indien gelet wordt op de hoeveelheid tijd die hiervoor nodig is. Het kwantificeren van de, voornamelijk visuele, waarnemingen moet dus op een andere manier gebeuren. Voorkomen moet worden dat subjectieve maatstaven bij de microscopische slibbeoordeling het onmogelijk maken dat de uitkomsten van waarnemingen, uitgevoerd door verschillende personen, onderling vergeleken worden. Een bepaalde vlokstructuur moet niet door de ene waarnemer als redelijk goed en door iemand anders als slecht gekarakteriseerd worden.

Dat soort problemen kan ondervangen worden door een soort "referentie" te creëren waarmee de verschillende waarnemers een microscopisch slibbeeld kunnen vergelijken. Op basis van deze vergelijking zou dan een bepaalde vlokstructuur etc. als goed of juist slecht gekarakteriseerd kunnen worden. Hiermee wordt een uniform hanteren van begrippen bereikt welke het mogelijk maakt om de uitkomsten van slibanalyses, uitgevoerd door verschillende waarnemers, met elkaar te vergelijken.

De, in het bovenstaande, bedoelde referenties bestaan in concreto uit foto's van diverse slibkwaliteitsparameters. In deze handleiding zal aan de hand van fotografisch materiaal aangegeven worden wat verstaan wordt onder b.v. een kompakte vlokstructuur of veel niet-vlokgebonden celmateriaal etc. Daarnaast zal van enkele slibkarakteristieken aangegeven worden op welke wijze de waarnemingen gekwantificeerd kunnen worden.

Het microscopisch beeld van een bepaald actief-slib moet altijd gebaseerd zijn op een aantal waarnemingen. Hiermee wordt bedoeld dat niet volstaan kan worden met het vastleggen van de kwaliteit van enkele slibvlokjes maar dat in een bepaald preparaat steeds een groot aantal vlokken bekeken moet worden voordat iets gezegd kan worden over de gemiddelde kwaliteit van de vlok in het betreffende slib.

Soms moeten zelfs meerdere preparaten bestudeerd worden. Dit is het gevolg van het feit

dat de biomassa niet bestaat uit uniforme deeltjes. Vaak is er sprake van vrij grote kwaliteitsverschillen tussen de vlokken onderling.

Voor het vastleggen en verwerken van de waarnemingen kan gebruik gemaakt worden van de analysestaten welke achterin deze handleiding zijn opgenomen.

4.2 Interpretatie van de waarnemingen

Het interpreteren van een microscopisch beeld is vaak niet zo eenvoudig. Of, met andere woorden gezegd: Welke betekenis moet eigenlijk toegekend worden aan de waarnemingen welke met behulp van een microscoop gedaan worden? Is het mogelijk om deze informatie te gebruiken om het zuiveringsproces beter te sturen? Op welke manier kunnen de microscopische waarnemingen eigenlijk vertaald worden in procestechnische begrippen en/of maatregelen?

Het microscopisch slibonderzoek levert informatie over een aantal visueel waarneembare karakteristieken van de vlok en de slibpopulatie. Op deze manier worden gegevens verkregen betreffende vlogkrootte, draadvormige bacteriën, protozoën etc. etc. Het functioneren van een zuiveringsinrichting wordt in sterke mate bepaald door de kwaliteit van de biomassa in het systeem. Veel storingen zijn een rechtstreeks gevolg van het feit dat de slibvlok niet in een optimale conditie verkeert. Het microscopisch slibonderzoek is een goed hulpmiddel om dit te signaleren. Het is eigenlijk onmisbaar om een goede diagnose te stellen. Dit is de eigenlijke functie van een microscopische slibbeoordeling. Dit wil niet zeggen, zoals soms gedacht wordt, dat men dan ook direct weet waardoor een eventueel afwijkende vlokkwaliteit veroorzaakt wordt. Het is dus bepaald niet zo dat men maar door een microscoop hoeft te kijken om te zien hoe de procesomstandigheden veranderd moeten worden om een bepaalde storing op te heffen. De hiervoor benodigde kennis ontbreekt nog grotendeels. Dit is een gevolg van het feit dat er nog maar erg weinig systematisch onderzoek verricht is op dit gebied. Het is mede de functie van deze handleiding dat dit soort systematisch onderzoek meer uitgevoerd kan gaan worden.

5 MORFOLOGIE VAN DE VLOK

In dit hoofdstuk zullen een aantal morfologische (morphos = vorm) kenmerken van de vlok uitvoerig besproken worden.

Het fenomeen licht slib en het protozoënbestand zullen in afzonderlijke hoofdstukken behandeld worden.

5.1 Vorm en structuur van de vlok

De vorm van een slibvlok kan variëren van een enigszins bolvormig en compact geheel tot een erg open en weinig afgeronde structuur.

De samenstelling van de vlokpopulatie is in belangrijke mate bepalend voor de vlokstructuur. Zo zal b.v. de aanwezigheid van draadvormige micro-organismen veelal – maar niet altijd! – een erg open vlokstructuur tot gevolg hebben. De draden vormen dan nl. een soort skelet waaromheen de vlok is opgebouwd. Daarnaast heeft ook de mate van turbulentie in de beluchtingsruimte invloed op de vorm van de vlokken; het is echter niet bekend hoe groot deze invloed is.

De vorm van de vlokken beïnvloedt de sedimentatie-snelheid van het slib in de nabezinktank. Uit het oogpunt van bezinkingseigenschappen zou dus een zo rond en compact mogelijke vlok te prefereren zijn. Veelal is dit echter toch niet ideaal. In de nabezinktank wordt ernaar gestreefd om een zo goed mogelijke scheiding van slib en effluent te bewerkstelligen. De hoeveelheid zwevende stof in het effluent moet zo klein mogelijk zijn. De zwevende stoffen bestaan voornamelijk uit kleine slibvlokjes welke uit zichzelf niet snel genoeg sedimenteren in de nabezinktank. Het merendeel van deze, in het slib aanwezige, kleine vlokjes bezinkt toch doordat ze ingevangen worden in de slibdeken. Dit invangen wordt beïnvloed door de vorm van de vlokken. In het algemeen verloopt dit invangen beter indien de vlokken niet al te mooi bolvormig zijn.

De stevigheid van de slibvlok wordt voor een belangrijk gedeelte bepaald door de belasting van de zuiveringsinrichting. Bij een heel lage slibbelasting (BOD-belasting $< 0,025$ gr BOD/g droge stof · dag) vertoont de vlok de neiging om uit elkaar te vallen in kleinere deeltjes. Kennelijk is bij dit soort belastingen onvoldoende voedsel beschikbaar om de vlokvormende organismen in leven te houden. Dit laatste speelt geen rol bij hoge belastingen (BOD-belasting groter dan $0,4$ à $0,6$ gr BOD/g droge stof · dag). Toch is bij de hogere belastingen vaak sprake van een erg losse vlok waarvan kleinere deeltjes gemakkelijk loslaten. Eén en ander is een gevolg van het feit dat bij deze belasting de bacteriën minder de neiging vertonen om vlokken te vormen (zie ook paragraaf 5.4). In het tussenliggende belastingtraject worden in het algemeen vrij stevige vlokken gevormd die wel tegen een stootje kunnen. Indien desondanks sprake is van erg veel losse cellen of kleine bacterie-agglomeraten dan is er vrijwel altijd sprake van een bepaalde storing in het zuiveringsproces of van een niet-optimale influentkwaliteit.

Indien gelet wordt op de vorm en de structuur van slibvlokken dan kunnen de volgende typen onderscheiden worden:

- *compacte vlokken* (figuur 2). De vlokken hebben een min of meer afgeronde vorm. Binnen in de vlok zijn vrijwel geen open ruimten waarneembaar. Het aantal losse cellen (in de vloeistof tussen de vlokken) is gering.
- *onregelmatig gevormde vlokken* (figuur 3). De vlokken hebben een vorm welke sterk af-

wijkt van de bolvorm; aan diverse kanten steken uitlopers uit de vlok. Bij dit type vlok is, evenals bij de losse vlok, vaak sprake van veel niet-vlokgebonden celmateriaal.

- *open vlokken* (figuur 4). De vlokken vormen geen compact geheel, maar bestaan uit vlokdeeltjes welke door open ruimten van elkaar gescheiden zijn. Een open vlokstructuur is vaak, maar niet altijd, het gevolg van de aanwezigheid van draadvormige organismen.
- *losse vlokken* (figuur 5). Bij een stevige vlok is sprake van een duidelijke scheiding tussen de vlok en de omringende vloeistof. Dit is bij de losse vlok niet het geval. Een losse vlokstructuur gaat vrijwel altijd gepaard met veel niet-vlokgebonden celmateriaal. De overgang van vlok naar vloeistof is i.h.a. niet scherp begrensd doordat aan de randen van de vlokken veel cellen aanwezig zijn waarvan niet duidelijk is of ze los in de vloeistof liggen of dat ze vastzitten aan de vlok.
- *agglomeraten* (figuur 6). Deze bestaan uit een netwerk van draadvormige organismen waarin verschillende, meestal compacte, vlokjes aanwezig zijn. Het verschil met een *open vlokstructuur* bestaat hierin, dat pas gesproken wordt van een agglomeraat indien de vlokjes duidelijk ruimtelijk van elkaar gescheiden zijn. Deze agglomeraten worden vaak aangetroffen in slibben afkomstig uit oxydatiesloten.

De kwaliteit van de vlok in een bepaald actief-slib moet meestal door middel van een combinatie van de genoemde begrippen omschreven worden b.v. een losse open vlok.

5.2 Afmetingen van de vlok

Wanneer we spreken over de afmetingen van een slibvlok dan bedoelen we daar niet de grootte van de macroscopische slibvlokken mee, welke gevormd worden zodra de slib-massa tot rust komt; zoals b.v. in een bezinkglas duidelijk waargenomen kan worden. Deze agglomeraten, met een diameter van circa 10 mm, vertonen nauwelijks enige samenhang en vallen dan ook erg gemakkelijk weer uit elkaar. Zo'n agglomeraat bestaat uit een groot aantal veel kleinere deeltjes waarvan de diameter vrijwel altijd minder dan 1 mm bedraagt. Deze deeltjes worden bedoeld indien sprake is van actief-slibvlokken. Hun grootte is voornamelijk afhankelijk van de belasting van de zuiveringsinrichting, de kwaliteit van het influent en de turbulentie in de beluchtingsruimte. Met behulp van een geijkte micrometer, in het oculair van de microscoop, kan veelal snel worden vastgesteld hoeveel de diameter van het merendeel van de vlokken ongeveer bedraagt. Hierbij wordt de afstand tussen de twee het verst van elkaar gelegen punten gemeten; waarbij echter draadvormige organismen, welke uit de vlok steken, niet worden meegerekend. Bij agglomeraten wordt de diameter van de vlokjes gemeten.

Een drietal groepen, figuren 7 t/m 9, kunnen onderscheiden worden, nl.:

- | | |
|------------------------|--------------------------------------|
| 1. grote vlokken | diameter > 500 μ m |
| 2. middelgrote vlokken | 150 μ m < diameter < 500 μ m |
| 3. kleine vlokken | diameter < 150 μ m |

Een te kleine vlok heeft meestal een troebel effluent tot gevolg. Kleine vlokken kunnen een gevolg zijn van een erg lage slibbelasting, een te sterke turbulentie in de beluchtingsruimte, vergiftiging van de vlokpopulatie, de aanwezigheid van hoge concentraties van complexerende verbindingen etc. etc.

5.3 Samenstelling van de vlok

De variatie in de samenstelling van de vlokpopulatie (de diversiteit) en de aanwezigheid van karakteristieke bacteriegroepen houdt direct verband met de kwaliteit en de kwantiteit van de beschikbare voedingsstoffen. Een slibvlok bestaat meestal uit een heel scala aan micro-organismen. Juist door deze grote diversiteit is een actief-slibstelsel erg flexibel en kunnen een groot aantal verschillende verbindingen simultaan afgebroken c.q. omgezet worden. Met behulp van een microscoop kan veelal snel een redelijke indruk verkregen worden van de grote soortenrijkdom.

Hierbij behoeft alleen maar gelet te worden op de vorm en de afmetingen van de bacteriën welke de vlok vormen. Soms is echter de vlokpopulatie nogal eenzijdig samengesteld. De foto's 8 en 10 zijn voorbeelden van twee slibvlokken met een normale, respectievelijk een erg geringe diversiteit van de vlokpopulatie. Indien een slibvlok samengesteld is uit slechts enkele soorten, dan is er meestal sprake van een heel hoge slibbelasting (belasting groter dan ca. 1 gr BOD/g droge stof · dag) en/of een erg eenzijdig samengesteld influent. Een lage diversiteit maakt een rioolwaterzuiveringsinrichting nogal kwetsbaar omdat de werking van de installatie afhankelijk is van het functioneren van slechts enkele bacteriesoorten. Indien hiermee iets gebeurt dan is tegelijk het hele zuiveringsproces ontregeld.

Bij een grotere soortenrijkdom kan de functie van de bacteriën, welke ophouden te functioneren, veelal overgenomen worden door andere micro-organismen.

In een actief-slibvlok zijn soms conglomeraten aanwezig welke uit slechts één type cellen lijken te zijn samengesteld (zie bijv. figuur 11). Meestal is dan sprake van een bacteriestam waarvan de cellen omringd zijn door een slijmkapsel. Dit kapsel kit de cellen aan elkaar vast. Wanneer dit soort conglomeraten in actief-slib aanwezig is, dan betreft het meestal de bacterie *Zoogloea ramigera*. Deze bacterie vormt erg karakteristieke uitlopers vanuit de vlok (figuur 12). Het geheel doet enigszins denken aan een hand met vingers. Een massale groei van deze bacterie is meestal het gevolg van een hoge slibbelasting en/of een influent waarin bepaalde voedingsstoffen in onvoldoende mate aanwezig zijn. Een slib waarin de zogenaamde Zoogloea-kolonies in grote aantallen aanwezig zijn, bezinkt in het algemeen slecht.

De volumineuze Zoogloea-kolonies vergroten namelijk niet alleen het volume van de vlok aanzienlijk, maar binden bovendien veel water. Een hoge slibvolume-index is hiervan het gevolg.

Een actief-slibvlok bestaat voor het grootste deel uit levende en dode bacteriecellen. Daarnaast kunnen echter ook in vrijwel ieder slib macromoleculaire (an)organische deeltjes waargenomen worden welke duidelijk niet van bacteriële oorsprong zijn. Het betreft dan deeltjes welke met het influent aangevoerd worden en die vervolgens ingekapseld zijn door de slibvlokken. De organische deeltjes kunnen, behalve aan hun grootte, vooral herkend worden door hun enigszins vezelige structuur (figuur 13). De anorganische deeltjes, voornamelijk zandkorreltjes etc. hebben een grotere brekingsindex dan het overige vlok materiaal. Zij vallen daarom op door hun relatief grote helderheid (figuur 14). De mate waarin dit soort deeltjes aanwezig is, wordt voornamelijk bepaald door de aan-, resp. afwezigheid van een zandvang en/of voorbezinktank.

5.4 Disperse bacteriegroei

In een goed functionerend actief slibstelsel is vrijwel al het celmateriaal in de vorm van actief-slibvlokken aanwezig.

De aanwas van de biomassa vindt voornamelijk in de vorm van een toename van de vlokken plaats. Het schaarse, niet-vlokgebonden celmateriaal wordt grotendeels geconsumeerd door de protozoën uit het slib. Eén en ander heeft tot gevolg dat na verwijdering van de vlokken een praktisch heldere vloeistof overblijft. Soms is het effluent van een rioolwaterzuiveringsinrichting echter niet helder maar in meerdere of mindere mate troebel. Dit kan o.a. veroorzaakt worden door de aanwezigheid van veel, niet-vlokgebonden celmateriaal. Dit verschijnsel doet zich vooral voor bij hoge BOD-slibbelastingen en/of zuurstoflimitatie in de beluchtingsruimte. Bij een hoge belasting wordt de vlok zwakker, waardoor celmateriaal aan de rand van de vlok gemakkelijk loslaat. Bovendien zijn bij hoge belastingen ook buiten de vlok nog voldoende voedingsstoffen voor de bacteriën beschikbaar. Hierdoor wordt het gedispergeerd groeien van de slibpopulatie gestimuleerd. In extreme gevallen kan dit leiden tot een slib waarin nog nauwelijks vlokken aanwezig zijn.

Een zuurstoflimitatie tijdens de beluchtingsfase veroorzaakt een vergelijkbaar effect. Alleen is dan niet alleen sprake van de groei van (facultatief) anaërobe bacteriën in de vloeistof tussen de vlokken maar ook van een gedeeltelijk uit elkaar vallen van de slibvlokken. Dit wordt veroorzaakt door het afsterven van strict aërobe organismen in de vlok. In feite is dus eigenlijk sprake van een soort vergiftiging van de aërobe slibpopulatie. Hetzelfde zien we gebeuren indien de biomassa echt vergiftigd wordt door b.v. de lozing van bepaalde metalen etc. Ook dan is vrijwel altijd sprake van een sterke toename van de hoeveelheid niet-vlokgebonden (losse cellen en minuscule vlokjes) celmateriaal.

Het verschil tussen levende en dode cellen is overigens met fasecontrast of helderveld microscopie niet te zien. Indien men iets wil weten over de activiteit van de biomassa dan is men aangewezen op andere methoden. De mate waarin sprake is van disperse groei kan redelijk goed visueel gekwantificeerd worden. De figuren 2 en 3 zijn voorbeelden van slibben met weinig, respectievelijk veel niet-vlokgebonden celmateriaal. De donkere puntjes op figuur 3 zijn allemaal bacteriecellen.

In actief-slib kunnen soms uiterst beweeglijke bacteriën waargenomen worden waarvan de celvorm op een spiraal of een kurketrekker lijkt. Dit zijn Spirocheten. Deze bacteriën hebben een erg karakteristieke vorm en vallen daardoor sterk op (figuur 15). Het is niet bekend of hun aan- of afwezigheid in de slibpopulatie een speciale betekenis heeft.

Ze worden weliswaar nogal eens in rwzi's aangetroffen waar sprake is van een lage O_2 -concentratie in de beluchtingsruimte, maar omdat de Spirocheten ook bij hogere zuurstofconcentraties waargenomen zijn, kunnen ze waarschijnlijk niet als een soort indicatororganisme voor de zuurstofconcentratie gebruikt worden.

De Spirocheten worden voornamelijk in de zomermaanden in actief slib aangetroffen, en dan nog voornamelijk in laag-belaste zuiveringssystemen.

In het kader van een microscopische slibbeoordeling kan volstaan worden met de constatering of Spirocheten wel of niet in grote aantallen aanwezig zijn.

6 LICHT SLIB

6.1 Inleiding

De laatste fase van het zuiveringsproces bestaat uit een scheiding van de actief-slibvlokken en het effluent. De bedrijfsvoering van de zuiveringsinrichting is er altijd op gericht om een helder effluent te produceren. Dit lukt niet altijd. De aanwezigheid van zwevende stoffen in het effluent kan verschillende oorzaken hebben. Genoemd kunnen worden:

1. Disperse bacteriegroei resulteert in deeltjes die niet bezinken in de nabezinktank.
2. Deflocculatie van slibvlokken ten gevolge van een te sterke turbulentie in de beluchtingstank, vergiftiging van het slib etc.
3. Onvolledig invangen van kleine vlokjes door de slibdeken in de nabezinktank. Deze kleine, zogenaamde "pin-point"-vlokjes worden dan met het effluent afgevoerd.
4. Een hydraulische overbelasting van de nabezinktank veroorzaakt soms slibverliezen, terwijl het slib in feite goede bezinkeigenschappen heeft.
5. Een verkeerde constructie van de nabezinktank waardoor de mesbelasting niet overal even groot is.
6. Opdrijvend slib ten gevolge van denitrificatie-processen in de nabezinktank, de aanwezigheid van vetbolletjes in de slibvlok, een sterke groei van de bacteriestam *Nocardia*, het insluiten van luchtbelletjes door de vlok etc.
7. Een te lange verblijftijd van het slib op de bodem van de nabezinktank, b.v. doordat de slibruimer niet goed functioneert, heeft tot gevolg dat het slib anaëroob wordt. Dit gaat gepaard met een gasontwikkeling. Eén en ander blijkt vaak uit het opdrijven van "prop-pen" slib.
8. Het slib heeft slechte bezinkeigenschappen doordat sprake is van een massale groei van draadvormige micro-organismen en/of Zoogloea-bacteriën.

We spreken alleen dan van licht slib indien sprake is van de onder punt 8 genoemde situatie. Het gebruik van de term licht slib voor de andere genoemde mogelijkheden van slibverliezen is onjuist, en werkt verwarrend.

Licht slib kan als volgt gedefinieerd worden: Slib dat slechts langzaam bezinkt en indikt doordat er sprake is van een sterke groei van draadvormige en/of Zoogloea organismen. De slibvolume index (het volume van 1 gram slib) is een maat voor de bezinkeigenschappen van het slib. Wanneer deze de waarde van 150 ml/g (bepaald volgens de verdunningsmethode) overschrijdt, dan is er sprake van licht slib. De waarde van 150 ml/g is een arbitraire keuze. Indien deze waarde overschreden wordt, dan zal dit vaak problemen opleveren, b.v. slibverliezen met het effluent. Eén en ander wil overigens niet zeggen dat dit nooit gebeurt indien de index kleiner is dan 150 ml/g. Dit houdt namelijk ten nauwste verband met de hydraulische belasting van de installatie, de constructie van de nabezinktank etc. Pas bij een index kleiner dan 100 ml/g is sprake van echt goed bezinkbaar slib. Het traject van 100–150 ml/g is dus een kritisch gebied.

De bezinkeigenschappen van de vlok worden voornamelijk bepaald door:

1. De mate waarin draadvormige micro-organismen aanwezig zijn.
2. Het gehalte aan slijmstoffen etc. Dit soort polymere verbindingen welke door micro-organismen geproduceerd worden, is in het algemeen erg waterrijk. Deze slijmstoffen, voornamelijk bacteriekapsels etc., zijn daardoor de oorzaak van het ontstaan van volumineuze vlokken.

Aan het ontstaan van licht slib kunnen dus twee verschillende factoren bijdragen. Van daar dat in de literatuur over dit onderwerp ook onderscheid gemaakt wordt tussen draadvormig en Zoogloea licht slib. In feite is dit onderscheid echter minder juist aangezien de aanwezigheid van draadvormige micro-organismen niet behoeft in te houden dat geen Zoogloea-achtige bacteriën aanwezig zijn. Vooral in conventionele actief-slibsystemen worden bezinkingsproblemen vaak veroorzaakt doordat zowel draadvormige als Zoogloea-organismen in grote aantallen aanwezig zijn. Een slecht bezinkbaar slib waarin draadvormige organismen volledig ontbreken, dus het "echte" Zoogloea-slib, wordt slechts incidenteel aangetroffen, en dan nog voornamelijk in hoogbelaste zuiveringsinstallaties. De bezinkingsproblemen in oxydatiesloten, carroussels etc. (dus in laagbelaste systemen) worden praktisch voor 100% veroorzaakt door de draadvormige organismen. De Zoogloea bacteriën spelen onder deze omstandigheden nauwelijks een rol van betekenis.

6.2 Zoogloea slib

In paragraaf 5.3 en ook in de inleiding van dit hoofdstuk is al wat gezegd over de invloed van de aanwezigheid van Zoogloea bacteriën op de bezinkbaarheid van het slib. Indien dit soort bacteriën in grote aantallen aanwezig is dan heeft dit een volumineus karakter van de slibvlok tot gevolg. De grote hoeveelheid, door de slijmkapsels etc. gebonden water verhindert een snelle bezinking van de slibvlok. De slechte bezinkingseigenschappen van dit type slib zijn overigens op basis van microscopische waarnemingen nauwelijks te voorspellen. Dit heeft te maken met het feit dat Zoogloea bacteriën vaak moeilijk te onderscheiden zijn van de andere micro-organismen in de slibvlok. De zo karakteristieke uitlopers (zie figuur 12) worden praktisch alleen aan de rand van een slibvlok aangetroffen. Hun aantal is echter meestal niet zo groot.

6.3 Draadvormig slib

In vrijwel ieder actief-slib zijn draadvormige micro-organismen aanwezig. Ze behoren dus eigenlijk tot de normale slibpopulatie. Hun aanwezigheid kan zelfs bijdragen tot een betere vlokwaliteit, hetgeen o.a. blijkt uit de vaak erg goede effluentkwaliteit van de rwzi's waar in het slib draadvormige bacteriën aanwezig zijn. Zolang het aantal draadvormige bacteriën maar binnen redelijke grenzen blijft is er dus niets aan de hand. Echte problemen ontstaan pas zodra er sprake is van een massale groei van draadvormige micro-organismen. Uit diverse onderzoeken – o.a. in Duitsland, Engeland en Nederland – is gebleken dat op 40–50% van alle zuiveringsinstallaties sprake is van dit soort licht slibproblemen. In sommige zuiveringsinstallaties heeft men vrijwel continu licht slib, in andere daarentegen fluctueert het bestand aan draadvormige bacteriën erg sterk. Eén en ander houdt vooral verband met de slibleeftijd; is deze lang, dan verandert de slibkwaliteit in het algemeen natuurlijk ook niet zo erg snel.

6.3.1 draadvormige micro-organismen

Licht slib wordt veroorzaakt door een massale groei van draadvormige micro-organismen. Hoewel schimmels incidenteel ook bezinkingsproblemen veroorzaken, is in licht slib vrijwel altijd sprake van draadvormige bacteriën. Een bacterie is een rond of staafvormig, éencellig organisme, dat zich voortplant door middel van een deling van de cel. Hierbij ontstaan 2 nieuwe cellen die elkaar vervolgens meestal los laten. Dit laatste gebeurt echter niet bij draadvormige bacteriën. Zo'n draad bestaat dus in feite uit een ketting

van cellen. Deze cellen delen zich gewoon maar laten elkaar daarna niet meer los. Soms kunnen ze elkaar ook niet meer loslaten doordat de cellen omgeven zijn door een omhulsel, een zogenaamde schede (zie figuur 16). Met een normale lichtmicroscop kunnen de dwarswanden tussen de cellen in een draad meestal zonder problemen waargenomen worden (zie b.v. figuur 33). In sommige draadvormige bacteriën zijn de dwarswanden op deze manier echter niet of nauwelijks te zien (zie figuur 35). Dit wil echter niet zeggen dat ze dan ontbreken; met een elektronenmicroscop kunnen ze namelijk wel waargenomen worden (zie figuur 17).

Het groeien in de vorm van een draad is karakteristiek voor bepaalde bacteriegeslachten. Dit wil zeggen dat deze bacteriën onder praktisch alle omstandigheden draden vormen. De veronderstelling, welke soms wel eens geopperd is, dat de meeste draadvormige bacteriën onder andere omstandigheden normaal losse cellen vormen – het groeien in de vorm van een draad zou een abnormaliteit zijn – is pertinent onjuist.

In het verleden werd *Sphaerotilus natans* verantwoordelijk geacht voor vrijwel alle licht slibproblemen. Recent onderzoek heeft echter uitgewezen dat enkele tientallen draadvormige bacteriën licht slib kunnen veroorzaken. Deze worden overigens niet allemaal even frequent aangetroffen. Aangezien het merendeel van deze draadvormige bacteriën tot voor kort volledig onbekend was, hebben ze nog geen naam. Dit is de reden waarom deze onbekende typen, ook in deze handleiding, aangeduid worden met een nummer.

Er is dus sprake van een grote verscheidenheid aan draadvormige micro-organismen in actief-slib. Sommige soorten vormen lange, robuuste draden, andere daarentegen korte dunne draden. Bepaalde draadvormige bacteriën worden voornamelijk in de vlok aangetroffen terwijl andere soorten juist in de vloeistoffase tussen de vlokken massaal vertegenwoordigd zijn. Het zal duidelijk zijn dat de verschillende draadvormige organismen de bezinkeigenschappen van de vlok niet allemaal op dezelfde manier beïnvloeden. Het is zelfs zo dat bepaalde draadvormige organismen deze bezinkeigenschappen vrijwel niet negatief beïnvloeden; andere soorten doen dit daarentegen juist erg sterk. Het is dus belangrijk om de populatie van draadvormige bacteriën in een bepaalde rwzi regelmatig te controleren teneinde tijdig de ontwikkeling van bepaalde ongewenste soorten te kunnen signaleren.

6.3.2 kwantificering van de mate van draadvorming

In sommige actief-slibben ontbreken de draadvormige bacteriën bijna volledig, in andere slibben daarentegen zijn ze zo massaal vertegenwoordigd dat het microscopisch beeld er volledig door wordt gedomineerd.

Tussen deze 2 uitersten zijn een groot aantal gradaties mogelijk. Veelal is het gewenst om het aantal draadvormige bacteriën in een slib op de één of andere manier te kwantificeren wanneer een microscopisch beeld bepaald wordt. Dit maakt het namelijk mogelijk om veranderingen in de slibpopulatie, b.v. als gevolg van een bepaalde licht slib bestrijdingsmethode, in de loop van de tijd vast te leggen.

In theorie is het mogelijk om het aantal draden in een bepaald slib door middel van tellen en meten vrij exact te bepalen. Dit is echter niet alleen een uiterst tijdrovende bezigheid maar bovendien alleen uitvoerbaar indien het betrekkelijk rechte draden betreft. Sterk gebogen draden, die vaak kluwens vormen en dwars door delen van de vlok heenlopen kunnen op deze manier niet gemeten worden. Voor het routine-matig onderzoeken van

veel slibmonsters is deze methode dus niet erg geschikt. Een veel eenvoudiger, en daardoor tevens snel uitvoerbare, manier bestaat hieruit, dat "op het oog" een globale schatting gemaakt wordt van het aantal draadvormige organismen welke in een bepaald slibmonster aanwezig zijn. Het aantal draden wordt dus eigenlijk "visueel gekwantificeerd". Dit lijkt weinig exact, maar de praktijk heeft uitgewezen dat deze methode niet alleen snel uitvoerbaar is maar ook bruikbare informatie oplevert.

Op basis van een visuele beoordeling kunnen een vijftal categorieën onderscheiden worden, nl.:

categorie 0: praktisch geen draadvormige micro-organismen (= m.o.) aanwezig (figuur 18)

categorie 1: weinig draadvormige m.o. aanwezig (figuur 19)

categorie 2: vrij veel draadvormige m.o. aanwezig (figuren 20 en 21)

categorie 3: veel draadvormige m.o. aanwezig (figuren 22 en 23)

categorie 4: erg veel draadvormige m.o. aanwezig (figuren 24 en 25)

Het aantal van 5 verschillende groepen is natuurlijk een arbitraire keuze, maar het is gebleken dat dit voldoende is om de verschillende slibkwaliteiten op de juiste manier in te kunnen delen. Een geringer aantal categorieën heeft als voornaamste nadeel dat veranderingen in het aantal draadvormige bacteriën moeilijker vastgelegd kunnen worden, aangezien het verschil tussen b.v. 2 en 3 te groot wordt. Een groter aantal categorieën maakt het systeem onnodig ingewikkeld doordat de verschillen tussen de diverse categorieën dan zo klein worden dat het indelen in de juiste categorie problematisch wordt.

Het is veelal noodzakelijk dat bij het bepalen van de juiste categorie de moeite genomen wordt om een slibpreparaat grondig te bestuderen alvorens tot de indeling bij een bepaalde groep besloten wordt. Soms is het gewenst om meerdere preparaten te bestuderen. Dit is een gevolg van het feit dat de draadvormige bacteriën in een bepaald slib vaak niet gelijkmatig over de verschillende vlokken en de waterfase daartussen verdeeld zijn. In hetzelfde slib kunnen vlokken aanwezig zijn welke vrij zijn van draden, terwijl andere vlokken daarentegen praktisch omringd zijn door draadvormige bacteriën. Dit verschijnsel doet zich overigens alleen voor bij de lagere categorieën. In deze gevallen wordt een gemiddelde waarde opgegeven.

De indeling in categorieën wordt in eerste instantie gebaseerd op de waarnemingen bij een vergroting van 100–200 x. Soms blijkt het echter nodig om deze indeling te herzien indien het slib bij een sterkere vergroting bestudeerd wordt. Dit is een gevolg van het feit dat de dunnere draden soms over het hoofd gezien worden bij een lage vergroting.

6.3.3 de begrippen "dominerend" en "secundair"

In een bepaald actief-slib zijn vaak tegelijkertijd verschillende draadvormige micro-organismen aanwezig. Hierdoor wordt het identificeren van deze draadvormers natuurlijk wel lastig. Veelal is het probleem toch minder gecompliceerd dan het zo op het eerste gezicht lijkt, omdat de verschillende typen niet in gelijke aantallen aanwezig zijn. Vooral in de oxydatiesloten en carousels is de populatie van draadvormige bacteriën meestal zodanig samengesteld, dat één, hooguit twee, type(n) in veel grotere aantallen aanwezig zijn dan de overige draadvormers. Dit is de reden waarom onderscheid gemaakt wordt tussen dominerende en secundaire draadvormige bacteriën in een bepaald actief-slib. Als een soort vuistregel geldt dat een bepaalde draadvorm "secundair aanwezig" genoemd wordt in-

dien hun aantal 10–20 maal zo klein is als dat van de dominerende vorm(en). In principe wordt dit onderscheid gebaseerd op de waarnemingen bij de vergroting welke ook gebruikt wordt om de draadvormige organismen te identificeren; c.q. 500–1000 maal. Hierbij is het overigens riskant om alleen af te gaan op de waarnemingen aan ongekleurde preparaten. Sommige draadvormige bacteriën (b.v. *Nostocoida limicola* en Type 0092) zijn vaak grotendeels omgeven door delen van de vlok en kunnen zodoende gemakkelijk over het hoofd gezien worden. Een juiste indruk van het aantal aanwezige draden van deze typen krijgt men pas na het bestuderen van gekleurde preparaten (zie paragraaf 7.2).

Er is reeds gesteld dat in laag belaste actief-slibsystemen meestal sprake is van hooguit 2 dominerende typen. Een populatie welke b.v. in een oxydatiesloot zeer frequent aange troffen wordt bestaat uit:

<i>Microthrix parvicella</i>	dominerend
Type 0092	secundair
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	"
Type 0041	"

In de meer conventionele zuiveringsinrichtingen is, vooral indien er sprake is van een relatief grote hoeveelheid afvalwater van niet-huishoudelijke oorsprong, het beeld vaak gecompliceerder. In deze slibben komen nogal eens tegelijkertijd 3 à 4 verschillende draadvormige bacteriën in grote aantallen voor.

Het onderscheid dominerend/secundair staat overigens grotendeels los van de in de vorige paragraaf besproken categorie-indeling. Dit betekent dat bij iedere categorie onderscheid gemaakt moet worden tussen dominerende en secundaire draadvormige organismen. Alleen bij de lagere categorieën (1, soms ook 2) komt het nog wel eens voor dat er geen sprake is van een duidelijke dominerende vorm. In zo'n geval noemen we alle typen secundair.

Men kan zich afvragen in hoeverre het zinvol is om draadvormige organismen te identificeren welke in zulke geringe aantallen aanwezig zijn dat hun aanwezigheid als "secundair aanwezig" gekwalificeerd moet worden. Of, met andere woorden, waarom zou men zich eigenlijk druk maken om draadvormige organismen die, omdat hun aantal in een bepaald slib zo gering is, nauwelijks invloed hebben op de bezinkeigenschappen van het slib. Dit is op zichzelf een redelijke vraag. Men moet zich echter realiseren dat de biomassa in een zuiveringsinrichting onderhevig is aan voortdurende veranderingen. Het is een dynamisch geheel waarbij steeds verschuivingen binnen de populatie optreden; vooral in systemen met korte slibleeftijden is dit regelmatig het geval.

Niet alle draadvormige organismen veroorzaken evenveel problemen. Dit houdt o.a. verband met hun vorm (robuste draden beïnvloeden i.h.a. de bezinkeigenschappen sterker dan dunne gebogen draadjes) en het feit dat gebleken is dat bepaalde typen zich veel massaler kunnen ontwikkelen dan andere draadvormige bacteriën. Het is wel degelijk belangrijk om de populatie van draadvormige organismen steeds zo goed mogelijk te beschrijven. Alleen op deze manier kan een juist beeld verkregen worden van verschuivingen welke binnen de populatie in de loop van de tijd plaats vinden. Men is er dan tijdig op voorbereid indien een type draadvormer de kop opsteekt waarvan bekend is (uit de literatuur of uit eigen ervaring!) dat deze ernstige bezinkingsproblemen kan veroorzaken. Het omgekeerde is natuurlijk ook het geval.

Daar komt nog bij dat het wel of niet aanwezig zijn van bepaalde typen soms informatie oplevert over het functioneren van de zuiveringsinrichting. In dit opzicht kunnen sommige draadvormige organismen de rol van indicator-organisme vervullen. Zo zal b.v. de aanwezigheid van de bacteriën *Thiotrix* en/of *Beggiatoa* vrijwel altijd veroorzaakt worden door een te lage O_2 inbreng of door de aanvoer van aangerot rioolwater.

7 DETERMINATIE VAN DRAADVORMIGE MICRO-ORGANISMEN

In dit hoofdstuk zal aangegeven worden op welke manier de verschillende draadvormige organismen van elkaar onderscheiden kunnen worden. Centraal staat het determinatieschema (zie paragraaf 7.4). In dit schema zijn overigens niet alle, tot nu toe bekende, draadvormige organismen opgenomen. Bij het opstellen van dit schema, dat uitvoerig getest is, is er rekening mee gehouden dat degenen welke de microscopische slijbbeoordeling routinematig uitvoeren niet kunnen beschikken over kostbare apparatuur als b.v. een elektronen-microscop. In de determinatietabel zijn dan ook alleen maar karakteristieke kenmerken opgenomen welke m.b.v. een normale fase-contrast microscoop waargenomen kunnen worden.

7.1 Morfologische kenmerken

Wanneer bacteriën met behulp van een microscoop bestudeerd worden, dan wordt gelet op de lengte en dikte van de cellen, insluitsels, dwarswanden, beweeglijkheid etc.; dus voornamelijk kenmerken welke te maken hebben met de morfologie van een cel. Achtereenvolgens zullen nu die kenmerken besproken worden welke in het kader van deze handleiding van belang zijn. Eén en ander zal toegelicht worden aan de hand van een aantal tekeningen (figuren 26 en 26a, pp. 26–27). Het merendeel van deze karakteristieken kan overigens alleen bij een vergroting van 500–1000 x juist beoordeeld worden.

Celvorm. Bij losse bacteriecellen kunnen de volgende celvormen onderscheiden worden:

- | | |
|---------------------|---|
| – bolvorm of coccus | de cellen zijn ongeveer rond. |
| – staafvorm | de lengte van de tamelijk rechte cellen is duidelijk groter dan de celdiameter. |
| – spiraalvorm | de lengte van de spiraalvorming gedraaide cellen is altijd veel groter dan de celdiameter. We onderscheiden hierbij spirocheten (flexibele cel) en spirillen (cel niet flexibel). |
| – vibrio-vorm | de cellen zijn enigszins gebogen. |

Draadvormige micro-organismen bestaan uit coccus- of staafvormige cellen of celvormen welke hiervan afgeleid zijn. Hiermee wordt bedoeld dat de cellen in een draad, doordat soms geen sprake is van een insnoering van de gemeenschappelijke buitenwand op de plaats van een dwarswand, vaak ongeveer vierkant of rechthoekig zijn.

Septa of dwarswanden. De gemeenschappelijke wanden tussen aan elkaar grenzende cellen. In sommige draadvormige bacteriën zijn deze dwarswanden met behulp van een normale lichtmicroscop overigens niet waarneembaar.

Insnoeringen. Bij sommige draadvormige bacteriën is sprake van een "ononderbroken" buitenwand. De plaats van de septa wordt niet geaccentueerd door een insnoering van deze wand. In andere draadvormige bacteriën is dit wel het geval.

Schede. Dit is de naam voor de cilindrische mantel waardoor de cellen bij sommige bacteriestammen omgeven zijn. De schede is veelal met een lichtmicroscop niet of slecht te zien. Alleen de lege scheden kunnen op deze manier waargenomen worden. De aanwezigheid van een schede blijkt soms uit het feit dat tussen de cellen in de draad en het overige vlok materiaal een kleine ruimte overblijft. Ook in Gramkleuringen kunnen de scheden vaak duidelijker waargenomen worden.

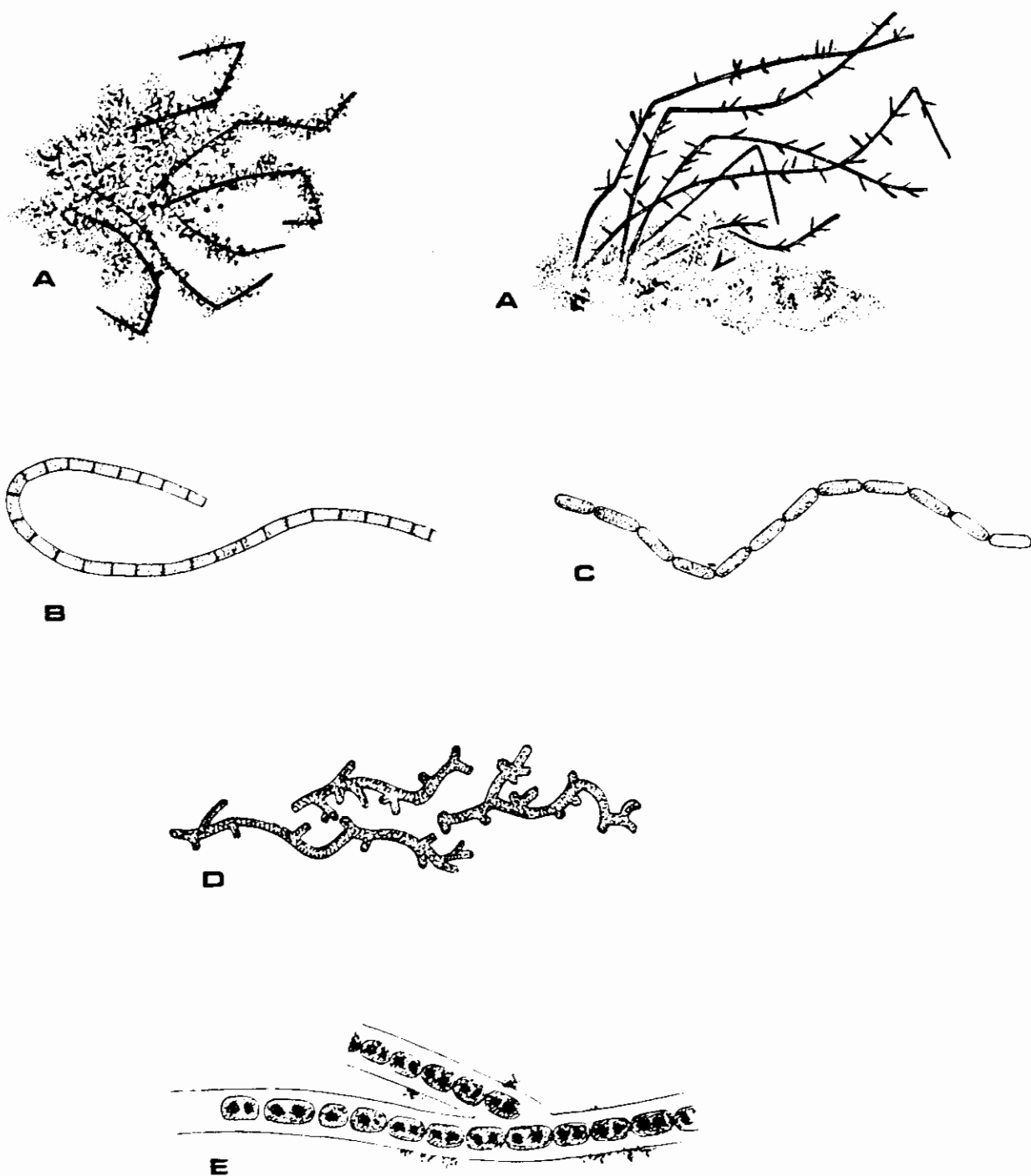


Fig. 26. Diverse morfologische kenmerken

- A: Aangroei van de filamenten
- B: Geen insnoeringen van de buitenwand
- C: Duidelijke insnoeringen aanwezig
- D: Echte vertakkingen
- E: Valse vertakking; de cellen zijn omgeven door een schede.

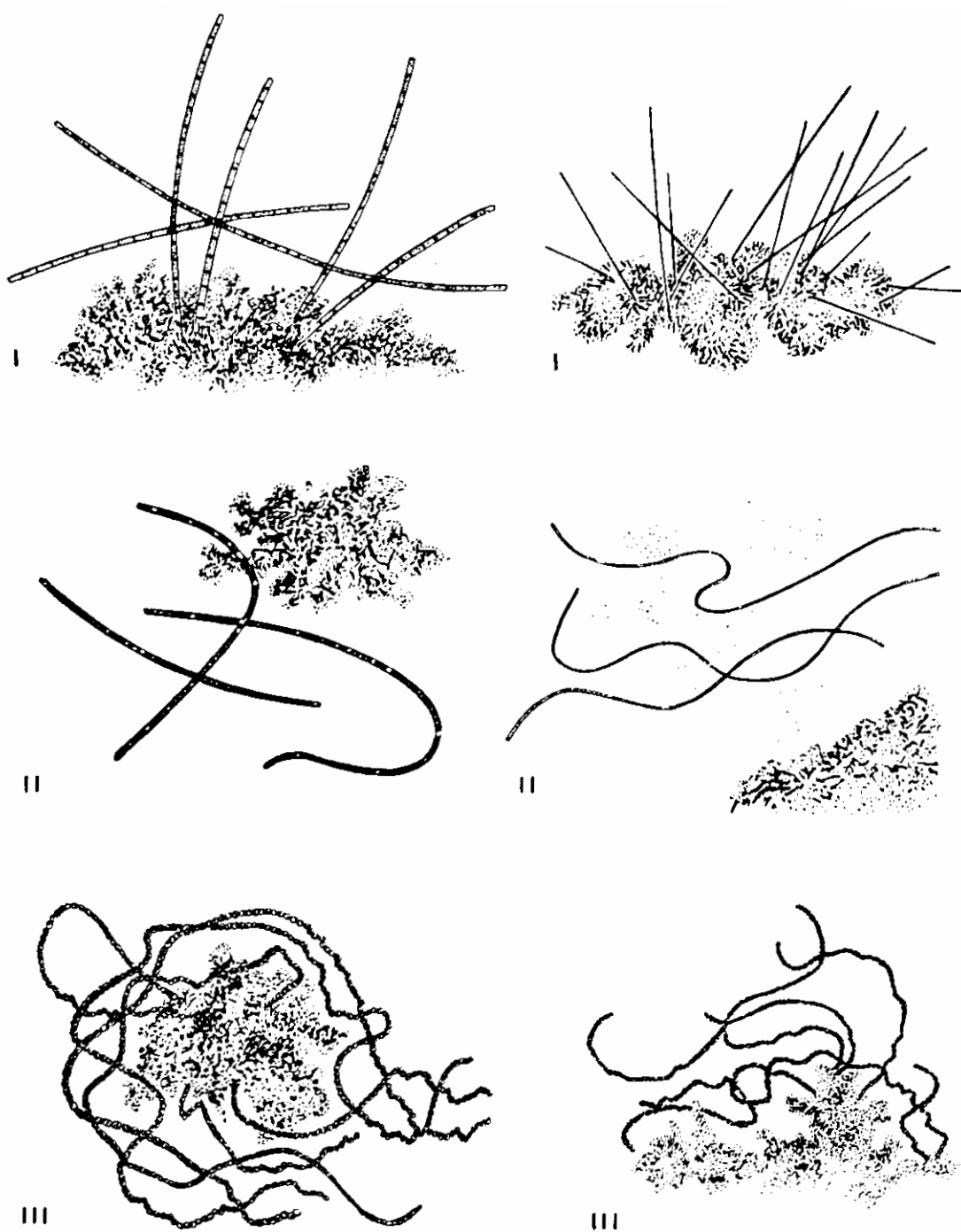


Fig. 26a. **Vorm van de filamenten**
 I: rechte filamenten
 II: gebogen filamenten
 III: kronkelige filamenten

Aangroei. Het oppervlak (de buitenwand) van de draadvormige organismen is meestal "glad". Soms hebben zich echter andere bacteriecellen, of kleine vlokjes, vastgezet op het oppervlak van de draden. Dit noemen we in de handleiding "aangroei van de draden". Het verschijnsel aangroei doet zich overigens voornamelijk voor bij bacteriën welke omgeven zijn door een schede. We spreken alleen dan van aangroei indien zich vrij veel éencellige organismen vastgezet hebben op de oppervlak van de draden.

Insluitsels. In de cellen van sommige draadvormige organismen zijn soms donkere, of juist sterk oplichtende, bolletjes aanwezig. Deze bestaan uit voedselreserves welke door de cel opgeslagen zijn. De bolletjes zijn meestal donker getint zolang ze nog klein zijn. De grotere exemplaren daarentegen zijn sterk lichtbrekend en contrasteren sterk met het overige deel van de cel (zie b.v. figuur 47). De bolletjes bestaan uit zwavel of uit PHB (= poly- β -hydroxy butyraat). Het verschil tussen deze twee soorten bolletjes reservevoedsel is overigens moeilijk te zien. De zwavelbolletjes hebben een blauw-gele glans terwijl de PHB bolletjes geel getint zijn. Indien men zekerheid wil hebben om welke vorm van reservevoedsel het gaat dan moet men wat ethanol door het preparaat mengen. De S-bolletjes lossen dan op, terwijl de PHB-granula intact blijven.

Vorm van de draden. De vorm van de draden van de diverse draadvormige organismen is een belangrijk hulpmiddel bij het determineren. Onderscheiden worden:

1. "rechte" draden
2. gebogen draden
3. kronkelige draden

Hierbij moet echter opgemerkt worden dat rechte draden i.h.a. niet echt kaarsrecht zijn. Hoewel kaarsrechte draden wel voorkomen (b.v. *Haliscomenobacter hydrossis*) zijn in slib ook de rechte draden vaak enigszins gebogen. Dit is vooral het geval bij relatief lange draden.

Vertakkingen. De filamenten (= draden) van sommige draadvormige organismen zijn soms vertakt. Dit kan op 2 manieren gebeuren, nl.:

- a. de cellen zijn vertakt. Dit noemen we echte vertakkingen.
- b. vertakkingen welke ontstaan doordat bij een schedevormende bacterie een losse cel zich hecht aan de schede en vervolgens uitgroeit tot een nieuwe draad. Enigszins vergelijkbaar hiermee is een vertakking welke ontstaat doordat de schede beschadigd wordt waardoor een opening naar buiten ontstaat. De cel bij zo'n opening in de schede krijgt dan de mogelijkheid om alsnog verder uit te groeien en zo een zijtak te vormen. We spreken in deze gevallen van valse vertakkingen.

Echte vertakkingen komen hoofdzakelijk bij schimmels en *Nocardia* bacteriën voor. *Sphaerotilus natans* vormt vaak valse vertakkingen.

Rosetten. Incidenteel kunnen in slib draden waargenomen worden welke aan de basis met elkaar verbonden zijn. Dit heet een roset van draden. Eén en ander is een gevolg van het feit dat deze bacteriën aan de basis van het filament bepaalde stoffen uitscheiden waarmee ze zich vast kunnen zetten.

Beweeglijkheid. Slechts enkele draadvormige organismen zijn in staat om zich te ver-

plaatsen. Dit gebeurt d.m.v. een beweging welke bekend staat onder de naam "gliding movement". Het is enigszins te vergelijken met de manier waarop een worm zich voortbeweegt. Indien men denkt dat een bepaalde draadvorm beweeglijk is dan moet men zich er overigens wel goed van vergewissen dat geen sprake kan zijn van vloeistofstromingen in het preparaat tengevolge van de verdamping van het water.

7.2 Kleuringstechnieken

Het is mogelijk om diverse onderdelen van de cel door middel van specifieke kleuringen beter zichtbaar te maken. In deze handleiding zullen alleen de Gram- en de Neisser-kleuring aan de orde komen. Het principe van vrijwel alle kleuringen bestaat hieruit dat een bepaald onderdeel van de cel een kleurstof steviger bindt dan de andere delen van de cel. Tevens zal de zwavelopslagtest besproken worden. Dit is geen kleuring maar een test op het vermogen om S-bolletjes in de cel op te slaan.

7.2.1 kleuring volgens Gram

De Gram-kleuring is een onmisbaar hulpmiddel bij het determineren van bacteriën. Bij deze kleuring worden de bacteriën eerst blauw gekleurd m.b.v. carbolgentiaanviolet. Vervolgens worden de cellen gewassen met een alcoholoplossing. Tijdens deze behandeling laten de cellen van sommige bacterie-geslachten de geabsorbeerde blauwe kleurstof weer los. Deze bacteriën worden daarom Gram-negatief genoemd. Bij de Gram-positieve bacteriën kan het geabsorbeerde carbolgentiaanviolet niet verwijderd worden door middel van wassen met alcohol. De kleurloze, Gram-negatieve bacteriën worden vervolgens nagekleurd met safranine. Hierdoor krijgen ze een lichtrode kleur.

Benodigde oplossingen

A. Carbolgentiaanviolet-oplossing	Verdun 10 ml van de voorraadoplossing met 90 ml van een 5% phenol-oplossing.
Voorraadoplossing	Carbolgentiaanviolet 10 g; alcohol (96%) 90 ml.
B. Lugol's jodium-oplossing	Los 3 g KJ op in enkele cc's gedestilleerd water, voeg 1 g J ₂ toe en verdun tot 300 ml met gedestilleerd water.
C. Alcohol-oplossing	Verdun 7 ml van de voorraadoplossing met 1000 ml (96%) alcohol.
Voorraadoplossing	J ₂ 100 g KJ 40 g ethanol (96%) 1250 ml gedestilleerd water 100 ml
D. Safranine-oplossing	los 0,25 g safranine op in 10 ml (96%) ethanol en verdun met 100 ml gedestilleerd water.

Procedure kleuring

- Maak een zogenaamd droog preparaat (zie paragraaf 3.3).
- Oplossing A opbrengen, contacttijd 60 sec.; vervolgens de kleurstof van het glaasje af laten lopen.
- Oplossing B opbrengen, contacttijd 60 sec.; vervolgens de kleurstof van het glaasje af laten lopen.
- Dompel het preparaat gedurende 30 sec. onder in oplossing C. Het glaasje gedurende deze procedure zachtjes heen en weer bewegen.

- Preparaat schoonspoelen met leidingwater, de waterstraal zachtjes over de achterkant van het glaasje laten stromen.
- Oplossing D opbrengen, contacttijd 120 sec.; vervolgens het preparaat weer wassen m.b.v. leidingwater.
- Preparaat laten drogen en bestuderen met een helderveld objectief (400–600 x). Een blauwfilter versterkt het contrast.

Resultaten

Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën kleuren lichtrood, respectievelijk donkerblauw (figuren 27–29). De actief-slibpopulatie bestaat voor het overgrote deel uit Gram-negatieve bacteriën. Bij enkele draadvormige bacteriën, in het bijzonder Type 0041, doet zich soms het verschijnsel voor dat niet alle delen van een draad op dezelfde manier gekleurd worden. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door de aangroei van andere bacteriën aan een filament. De draad wordt dan enigszins afgeschermd, waardoor de blauwe kleurstof niet voldoende door kan dringen. In zo'n geval wordt bij de beoordeling van het resultaat van de kleuring voornamelijk gelet op de losliggende uiteinden van de draden.

Opmerkingen

- Het merendeel van de oplossingen kan ook kant en klaar gekocht worden.
- In de literatuur staan tientallen verschillende recepten voor de Gram-kleuring. Voor draadvormige organismen blijkt bovenstaand recept het beste te voldoen; c.q. het mooiste contrast te geven.
- De meeste oplossingen zijn vrijwel onbeperkt houdbaar. Oplossing C (niet de voorraadoplossing) moet 1 maal per maand vernieuwd worden.
- De objectglaasjes moeten goed ontvet zijn.

7.2.2 Neisser kleuring

In paragraaf 7.1 is al iets gezegd over het opslaan van *reservestoffen in de cel*. Sommige bacteriën vormen in de cel bolletjes welke voornamelijk bestaan uit polyfosfaten. Deze granulen kunnen zonder kleuring niet waargenomen worden. Door middel van de Neisser-kleuring worden ze echter blauw-zwart gekleurd. Deze polyfosfaat bolletjes kunnen overigens m.b.v. een elektronenmicroscopie duidelijk waargenomen worden (zie figuur 17).

Een tweetal bacteriën, *Nostocoida limicola* en Type 0092 worden met de kleuring helemaal grijs-blauw gekleurd. Waaraan dit toegeschreven moet worden is niet bekend. Het is echter wel een goed hulpmiddel bij het identificeren van deze 2 typen.

Benodigde oplossingen

A. Methyleenblauw	0,1 g
Ysazijn	5 ml
Ethanol 96%	5 ml
Gedestilleerd water	100 ml
B. Crystal violet, 10% in 96% ethanol	3,3 ml
Ethanol 96%	6,7 ml
Gedestilleerd water	100 ml
C. Chrysoidin Y, 1% waterige oplossing	33,3 ml
Gedestilleerd water	66,7 ml

Procedure kleuring

- Maak een droog preparaat.
- Breng een vers bereide oplossing op welk bestaat uit 2 delen A en 1 deel B, contacttijd 10–15 sec. Daarna overmaat kleurstof van het glaasje af laten lopen.
- Oplossing C opbrengen, contacttijd 45 sec.
- Glaasje spoelen met leidingwater, waterstraal tegen de achterkant van het glaasje houden.
- Preparaat laten drogen en vervolgens bekijken met een helderveldobjectief (ca. 500 x).

Resultaten

Neisser-negatieve draden kleuren lichtbruin (figuur 30). We spreken van een positieve reactie op deze kleuring indien de draden donkere granulen bevatten (figuur 31) of helemaal grijsblauw gekleurd worden (figuur 32).

Opmerkingen

- De oplossingen A t/m C zijn vrijwel onbeperkt houdbaar. Ze kunnen bij een normale chemicaliën-firma kant en klaar gekocht worden.
- De grootte van de polyfosfaatgranulen is afhankelijk van de voedingstoestand van de bacteriën. In draden afkomstig uit hoogbelaste zuiveringssystemen zijn deze bolletjes i.h.a. kleiner dan in slib afkomstig uit oxydatiesloten.

7.2.3 zwavelopslagtest

De bacteriën *Beggiatoa* en *Thiotrix* kunnen, indien ze groeien in een milieu waarin voldoende gereduceerde zwavelverbindingen aanwezig zijn, zwavel-bolletjes opslaan in hun cellen. Ook in actief-slib kunnen vertegenwoordigers van deze twee geslachten aangetroffen worden.

De zwavelbolletjes zijn dan echter niet altijd aanwezig. Dit bemoeilijkt een juiste determinatie. Door een behandeling met Na_2S is het mogelijk om deze draadvormige bacteriën in een kort tijdsbestek een groot aantal S-granulen op te laten slaan.

Procedure

Meng een bepaalde hoeveelheid actief-slib met een even groot volume van een Na_2S -oplossing (200 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ per 100 ml). Laat het mengsel 10–15 min. staan (enkele malen opschudden om het slib in suspensie te houden). Controleer daarna of er sprake is van een opslag van S-granulen door de cellen. De S-granulen zijn bij een vergroting van circa 500 x duidelijk te zien.

Resultaat

Thiotrix en *Beggiatoa* cellen slaan grote, sterk lichtbrekende granulen op (zie figuur 47). In de cellen van de andere draadvormige bacteriën worden geen of slechts kleine S-bolletjes gevormd.

7.3 Beschrijving van de draadvormige micro-organismen

In deze paragraaf zal een beschrijving gegeven worden van 29 draadvormige organismen welke in actief-slib waargenomen zijn. De organismen welke niet opgenomen zijn in het determinatieschema (zie paragraaf 7.4) zijn aangeduid met een *. Enkele uiterst zeldzame typen, welke op basis van morfologische kenmerken nauwelijks van andere draadvormige organismen onderscheiden kunnen worden, blijven buiten beschouwing. De

volgorde van bespreking is alfabetisch, respectievelijk een numerieke rangschikking van de organismen die nog geen naam hebben. De in deze beschrijving genoemde lengtes van de draden zijn overigens maximum waarden. Kortere exemplaren komen dus veelvuldig voor.

Beggiota

Gebogen, betrekkelijk korte draden (lengte $< 200 \mu\text{m}$) welke duidelijk een eigen beweging hebben. De filamenten worden los in de vloeistof tussen de vlokken aangetroffen. In slib worden, incidenteel, diverse typen aangetroffen welke kunnen variëren qua celvorm, diameter etc. De filamenten bevatten S-granulen en zijn Gram- en Neisser-negatief.

"Blauwwieren" (figuur 33)

Rechte, robuuste, onbeweeglijke draden; $300\text{--}1000 \mu\text{m}$ lang. De cellen (diameter $2,5\text{--}3,0 \mu\text{m}$) zijn vrijwel vierkant tot rechthoekig. Septa zijn erg duidelijk te zien; nauwelijks sprake van insnoeringen. Een schede ontbreekt meestal. Vertakkingen en aangroei worden vrijwel nooit waargenomen. Geen bolletjes reservestoffen in de cellen aanwezig. Gram- en Neisser-negatief. Incidenteel Gram-positief. Ook de reactie op de S-test is negatief.

Opm. Het is niet zeker dat dit inderdaad blauwwieren zijn. Morfologisch lijken ze er erg veel op, maar ze zijn onbeweeglijk en ook niet duidelijk gekleurd.

De filamenten van deze organismen lijken erg veel op die van Type 021 N. Bij dit laatste type is echter i.h.a. sprake van duidelijke insnoeringen in de celwand, terwijl de filamenten ook minder robuust zijn.

Flexibacter

Gebogen, betrekkelijk korte draden (lengte $< 200 \mu\text{m}$) welke duidelijk een eigen beweging vertonen. In slib worden, incidenteel, diverse vertegenwoordigers van deze bacteriefamilie aangetroffen, ze verschillen onderling qua celvorm, diameter draden etc. De filamenten, vrijwel altijd los in de vloeistof, bevatten geen S-granulen en reageren ook negatief op de S-test. Ze zijn Gram- en Neisser-negatief.

Haliscomenobacter hydrossis (figuur 34)

Korte (meestal $< 100 \mu\text{m}$) onbeweeglijke veelal kaarsrechte draden welke als naalden uit de vlok steken. Septa en/of insnoeringen niet zichtbaar. Schede aanwezig. Geen vertakkingen of bolletjes reservevoedsel. Cel diameter circa $0,3 \mu\text{m}$. Slechts incidenteel sprake van aangroei van de draden. Gram- en Neisser-negatief. Geen opslag van S-granulen.

Microthrix parvicella (figuren 35 en 36)

Sterk gebogen, vaak kronkelige draden, welke soms kluwens rondom en door de vlokken vormen. De onbeweeglijke draden zijn meestal $200\text{--}400 \mu\text{m}$ lang en hebben een diameter van circa $0,5 \mu\text{m}$. Septa en/of insnoeringen zijn met behulp van een lichtmicroscop vrijwel niet te zien. Geen schede aanwezig. Vertakkingen komen vrijwel niet voor. Slechts incidenteel enige aangroei. Geen zichtbare bolletjes reservestoffen in de draden aanwezig. Gram-positief. Neisser-positief (donkere polyfosfaat granulen); incidenteel negatief. S-test negatief.

M. parvicella lijkt op Type 0581 en *Nostocoida limicola* I. Type 0581 is echter gram-negatief, terwijl *N. limicola* I geen polyfosfaat granulen in de cel opslaat.

Nocardia (figuur 37)

Korte, lengte $< 100 \mu\text{m}$, sterk vertakte draden welke meestal omgeven zijn door delen van de vlok. De onbeweeglijke draden hebben een diameter van ongeveer $0,5 \mu\text{m}$. Septa en/of insnoeringen zijn met behulp van een lichtmicroscop niet te zien. Een schede ontbreekt. Geen aangroei; ook geen bolletjes reservestoffen. Gram-positief. Neisser-negatief. S-test negatief.

Nostocoida limicola I (figuur 38)

Gebogen, onbeweeglijke draden, de lengte varieert van $100\text{--}300 \mu\text{m}$. In de filamenten, welke voornamelijk los tussen de vlokken liggen, zijn de septa vaak moeilijk te zien. De cellen zijn ongeveer rond en hebben een diameter van $0,6\text{--}0,7 \mu\text{m}$. Insnoeringen zijn niet te zien. Een schede ontbreekt evenals vertakkingen. Geen aangroei. Reservestoffen, in de vorm van zichtbare bolletjes, worden niet aangetroffen. Gram-positief. S-test negatief. Neisser-positief (de draden kleuren helemaal grijs-blauw).

N.limicola I lijkt op *M.parvicella* en kan eigenlijk alleen op basis van de Neisser-kleuring van deze bacterie onderscheiden worden.

Nostocoida limicola II (figuur 39)

Zie *N.limicola I*; alleen zijn de filamenten iets dikker (diameter cellen $1,0\text{--}1,2 \mu\text{m}$). Septa en insnoeringen zijn beiden redelijk duidelijk te zien.

Nostocoida limicola III (figuur 40)

Kronkelige, onbeweeglijke draden welke vaak een kluwen vormen waaromheen een vlok is opgebouwd. De lengte van de filamenten is meestal niet te bepalen. Septa en insnoeringen zijn duidelijk te zien. De discusvormige cellen (diameter circa $1,5 \mu\text{m}$) zijn niet omringd door een schede. Vrijwel nooit vertakkingen. Gram-positief, S-test negatief. Neisser-positief (filamenten kleuren helemaal grijs-blauw).

Schimmels (figuur 41)

Lange, onbeweeglijke, robuuste, vertakte filamenten; $200\text{--}600 \mu\text{m}$ lang. Septa duidelijk te zien; nauwelijks sprake van insnoeringen. De rechthoekige cellen hebben een diameter welke kan variëren van $2,0\text{--}5,0 \mu\text{m}$; afhankelijk van het soort schimmel. Een schede ontbreekt. Geen aangroei. In de cellen zijn vaak duidelijke structuren te herkennen. Schimmels kleuren niet met de Gram-kleuring. Ze zijn Neisser-negatief. S-test negatief.

Sphaerotilus natans (figuren 42 en 43)

Deze bacterie vormt lange ($500\text{--}1000 \mu\text{m}$), onbeweeglijke, zwak gebogen draden welke meestal uit de vlok steken. De staafvormige cellen (lengte $1,5\text{--}5,0 \mu\text{m}$; diameter $1,2\text{--}2,0 \mu\text{m}$) zijn omringd door een schede en bevatten soms PHB granulen. De insnoeringen zijn vooral aan het uiteinde van een draad meestal duidelijk te zien. Valse vertakkingen komen veelvuldig voor. Soms is er sprake van aangroei van de schede. De bacterie is Gram- en Neisser-negatief. De zwavel-test resulteert niet in de vorming van S-granulen.

Niet vertakte filamenten kunnen verwisseld worden met de draden van het Type 021 N. Ook Thiotrix II lijkt op *S.natans*. Thiotrix reageert echter duidelijk positief op de S-test.

**Streptococcus* (figuur 44)

Gebogen, onbeweeglijke, korte (lengte $< 100 \mu\text{m}$) draden welke los in de vloeistof tussen de vlokken aangetroffen worden. De coccus-vormige cellen, diameter $0,7\text{--}0,8 \mu\text{m}$, zijn

niet omgeven door een schede. Aangroei van cellen ontbreekt; vertakkingen van de filamenten komen niet voor. Zichtbare bolletjes reservevoedsel worden niet gevormd. De reactie op de S-test is negatief.

De cellen zijn Gram-positief en Neisser-negatief.

Opm. Dit type lijkt morfologisch erg veel op een Streptococ. Het is echter niet helemaal zeker of deze naam correct is.

Dit type kan gemakkelijk verwisseld worden met Type 1863. Laatstgenoemde bacterie is echter duidelijk Gram-negatief.

Thiotrix I (figuren 45 t/m 47)

Zwak gebogen, onbeweeglijke draden welke voornamelijk radiaalsgewijs uit de vlokken steken. De lengte van de draden is sterk variabel (50–500 μm). De diameter van de rechthoekige cellen kan variëren van 0,4–1,5 μm . Deze grote spreiding is het gevolg van het feit dat bij deze bacterie de jonge cellen dunner zijn dan de oudere exemplaren.

In één en dezelfde draad kan dit verschil soms duidelijk waargenomen worden. Een schede ontbreekt. Geen vertakkingen of aangroei. De draden bevatten vaak zwavelbolletjes. De reactie op de S-test is zeer duidelijk positief. Gram-negatief. Neisser-negatief.

Opm. In sommige slibben is deze bacterie alleen in de vorm van korte (lengte tot 100 μm), dunne filamenten aanwezig. De septa zijn in deze draadjes dan moeilijk te zien. Echter wel een duidelijke positieve reactie op de S-test.

Thiotrix II (figuren 48 en 49)

Zwak gebogen, onbeweeglijke draden welke voornamelijk radiaalsgewijs uit de vlok steken. De lengte van de draden kan variëren van 200 tot 800 μm . De cellen, diameter 0,8–1,5 μm , zijn rechthoekig of staafvormig. Insnoeringen zijn meestal alleen aan het uiteinde van een filament te zien. Septa en de vorm van de cellen kunnen overigens alleen na verwijdering van de aanwezige S-granulen waargenomen worden. Aangroei en vertakkingen ontbreken. De cellen zijn omgeven door een schede. De cellen bevatten vaak S-granulen. De reactie op de S-test is uitgesproken positief. Gram-negatief. Neisser-negatief.

Deze draadvorm lijkt veel op *S. natans*. Laatstgenoemde bacterie reageert echter negatief op de S-test.

Type 0041 (figuren 50 en 51)

Rechte of enigszins gebogen, onbeweeglijke draden, 200–300 μm lang. De filamenten worden niet alleen los in de vloeistof maar ook ingebouwd in de slibvlokken aangetroffen. Vierkante tot rechthoekige cellen (diameter 1,0–1,4 μm , lengte 0,7–2,3 μm) welke omgeven zijn door een schede. Incidenteel vertakkingen. Vrijwel altijd sprake van een sterke aangroei, alleen in sommige industriële installaties ontbreekt deze. Septa duidelijk te zien. De cellen bevatten soms kleine S-granulen; zwak positieve reactie op de S-test. Neisser-negatief. Gram-positief; delen welke sterk begroeid zijn kleuren negatief of slechts zwak positief.

Draden zonder aangroei lijken op de filamenten van het Type 021 N. Laatstgenoemde bacterie is echter Gram-negatief.

Type 0092 (figuur 52)

Korte (lengte < 100 μm), vrij rechte, onbeweeglijke draden welke voornamelijk ingebouwd in de slibvlokken aangetroffen worden. Alleen in zuiveringsinrichtingen waarvan

het influent voor een groot deel van industriële oorsprong is kunnen de draden van dit type ook massaal in de vloeistof tussen de vlokken waargenomen worden. De cellen, diameter 0,5–0,7 μm , zijn rechthoekig; de septa zijn echter moeilijk te zien. Insnoeringen zijn niet aanwezig. Geen schede. Vertakkingen en aangroei ontbreken. Geen opslag van S-granulen; ook de reactie op de S-test is negatief. Gram-negatief. Neisser-positief (grijs-blauwe filamenten). De filamenten worden in niet-gekleurde preparaten gemakkelijk over het hoofd gezien omdat ze meestal voornamelijk in de vlokken aanwezig zijn. Pas bij de Neisser-kleuring krijgt men een goede indruk van hun werkelijke aantal.

Haliscomenobacter hydrossis en Type 0092 kunnen gemakkelijk verwisseld worden. Eerstgenoemde reageert echter negatief op de Neisser-kleuring.

***Type 0211 (figuur 53)**

Gebogen, of gekronkelde, onbeweeglijke filamenten (lengte < 100 μm) welke voornamelijk los in de vloeistof tussen de vlokken aangetroffen worden. De staafvormige cellen – de insnoeringen zijn vrij goed zichtbaar – hebben een diameter van 0,2–0,3 μm . Een schede ontbreekt. Vertakkingen komen niet voor. Geen aangroei van de filamenten. S- en/of PHB-granulen worden niet gevormd. De reactie op de S-test is negatief. De cellen zijn Gram- en Neisser-negatief.

Type 021 N (figuren 54 en 55)

Lange (500–1000 μm), enigszins gebogen, onbeweeglijke draden. Septa erg duidelijk te zien. De vorm van de cellen is sterk variabel. Deze kan variëren van korte (0,4–0,7 μm lang, diameter 1,8–2,9 μm) discussvormige tot lange (2,0–3,0 μm lang, diameter 0,6–0,8 μm) staafvormige cellen.

Alle overgangsvormen hiertussen zijn in principe mogelijk. Soms zijn in de filamenten enkele sterk lichtbrekende cellen aanwezig. Meestal is sprake van duidelijke insnoeringen op de plaats van de septa. Geen schede of vertakkingen. Incidenteel rosetten. Aangroei van de filamenten komt niet vaak voor. Kleine S-bolletjes worden soms in de cellen waargenomen. Gram-negatief. Soms zijn gedeelten van een draad zwak positief. Neisser-negatief. S-test meestal zwak positief.

Type 021 N kan verwisseld worden met Type 0041, *Sphaerotilus natans* en *Thiotrix*. Type 0041 is echter Gram-positief. *S. natans* heeft een andere celvorm terwijl *Thiotrix* duidelijk positief op de S-test reageert.

***Type 0411 (figuur 56)**

Gebogen of gekronkelde, korte (lengte 50–150 μm) onbeweeglijke draden welke voornamelijk aan de randen van de vlokken aangetroffen worden. De lange, staafvormige cellen – de insnoeringen zijn duidelijk te zien – hebben een diameter van 0,5–0,7 μm . Een schede is niet aanwezig. Vertakkingen worden niet gevormd. Aangroei van de filamenten komt niet voor. De cellen zijn Gram- en Neisser-negatief. Ook de reactie op de S-test is negatief.

Type 0581 (figuur 57)

Gebogen draden, meestal los in de waterfase, welke soms kluwens vormen. De onbeweeglijke draden zijn 100–300 μm lang en hebben een diameter van 0,3–0,4 μm . Septa en/of insnoeringen zijn met behulp van een lichtmicroscop niet te zien. Geen aangroei. Een schede ontbreekt. De filamenten vormen geen vertakkingen. Bolletjes reservestoffen ontbreken. Gram-negatief, Neisser-zwak positief. S-test negatief.

Het Type 0581 lijkt veel op *M. parvicella*. Laastgenoemde bacterie is echter Gram-positief, en vormt iets dikkere filamenten.

**Type 0675 (figuur 58)*

Dit micro-organisme lijkt sprekend op Type 0041, maar is alleen duidelijk dunner (diameter cellen 0,5–0,7 μm).

Type 0803 (figuren 59 en 60)

Rechte of gebogen, onbeweeglijke filamenten (lengte 100–300 μm) welke voornamelijk in de vloeistof tussen de vlokken aangetroffen worden. De cellen (diameter 0,7–0,8 μm) zijn vierkant tot rechthoekig. Geen insnoeringen van de celwand. De septa zijn soms moeilijk te zien doordat ze min of meer gemaskeerd worden door kleine, donkere bolletjes (samenstelling onbekend). Vaak hebben zich drie tot vier filamenten vastgezet op een brokje sterk lichtbrekend anorganisch materiaal (zie figuur 60). De draden zijn niet vertakt en ook niet omringd door een schede. Aangroei ontbreekt. In de cellen zijn geen S- of PHB-granulen aanwezig. De bacterie reageert negatief op de S-test. Gram- en Neisser-negatief.

Opm. Incidenteel wordt in sommige zuiveringsinrichtingen een draadvormige bacterie aangetroffen welke sprekend op Type 0803 lijkt, maar Gram-positief is.

Type 0914 (figuren 61 en 62)

Rechte tot enigszins gebogen, onbeweeglijke filamenten welke voornamelijk los in de vloeistof tussen de vlokken aanwezig zijn. De lengte van de draden kan variëren van 100–200 μm . De cellen hebben een diameter van 0,7–0,9 μm . Septa (zie figuur 62) zijn pas duidelijk te zien na verwijdering van de S-granulen (zie paragraaf 7.1). De cellen zijn vierkant tot rechthoekig (dus geen sprake van insnoeringen). Een schede ontbreekt. Geen vertakkingen of aangroei. In de cellen zijn reservevoorraden zwavel opgeslagen; echter meestal niet in de vorm van mooie ronde bolletjes, maar meer als granulair materiaal. Deze bacterie reageert, enigszins verrassend, negatief op de S-test. Gram-positief. Neisser-negatief.

Type 0961 (figuur 63)

Rechte, onbeweeglijke, vrij lange (lengte 300–500 μm) filamenten, welke meestal uit de vlokken steken. De rechthoekige cellen, diameter 1,1–1,5 μm , lijken vrijwel transparant. Insnoeringen en vertakkingen ontbreken. Een schede is niet aanwezig. Aangroei van filamenten komt niet voor. S- en/of PHB-granulen worden niet gevormd. De bacterie is Gram- en Neisser-negatief. S-test negatief.

Type 1701 (figuren 64 en 65)

De draden van dit type zijn meestal 100–200 μm lang, onbeweeglijk en enigszins gebogen (indien in de vlok, dan vaak kronkelige draden). De staafvormige cellen zijn 2,5–3,5 μm lang, hebben een diameter van 0,7–0,9 μm en zijn omringd door een schede. Ze bevatten soms kleine donkere PHB-bolletjes. Septa en insnoeringen zijn duidelijk te zien (vooral aan het uiteinde van de draden). Vertakkingen (valse) komen slechts incidenteel voor. Meestal is sprake van een sterke aangroei van het filament. Gram- en Neisser-negatief. Geen opslag van S-granulen.

**Type 1702 (figuur 65)*

Korte (lengte 50–150 μm), rechte, onbeweeglijke draden welke uit de vlok steken. De rechthoekige cellen hebben een diameter van circa 0,6 μm . Septa en/of insnoeringen zijn

meestal niet duidelijk te zien. De cellen zijn omgeven door een schede. Vertakkingen komen niet voor. Geen aangroei van de filamenten. Deze bacterie vormt geen zichtbare bolletjes reservevoedsel. De reactie op de S-test is negatief. De cellen zijn Gram- en Neisser-negatief.

Dit type kan gemakkelijk verwisseld worden met *H. hydrossis*. Laatstgenoemde bacterie vormt echter duidelijk dunnere filamenten.

Type 1851 (figuren 66 en 67)

Rechte of enigszins gebogen, onbeweeglijke draden, 200–400 μm lang. In de langere draden zijn soms knikken aanwezig. Soms worden bundels draden aangetroffen. Rechthoekige cellen (diameter 0,5–0,7 μm , lengte 1,7–3,5 μm) welke omgeven zijn door een schede. Septa moeilijk te zien. Geen vertakkingen of opslag van bolletjes reservestoffen. Vaak aangroei, maar vrijwel nooit massaal. Gram-positief (kleur echter niet zo erg donkerblauw). Neisser-negatief. S-test negatief.

**Type 1852 (figuur 68)*

Rechte, of enigszins gebogen, onbeweeglijke draden welke uit de vlok steken. De rechthoekige cellen hebben een diameter van 0,6–0,8 μm . Insnoeringen ontbreken. De cellen zijn, net als bij het Type 0961 enigszins transparant. Vertakkingen ontbreken. Hoewel de cellen omgeven zijn door een schede is aangroei van de filamenten nooit waargenomen. S- en/of PHB granulen worden niet gevormd. De reactie op de S-test is negatief. De cellen zijn Gram- en Neisser-negatief.

Type 1852 lijkt op Type 0961. Laatstgenoemde bacterie vormt echter veel robuustere filamenten.

Type 1863 (figuur 69)

Korte (lengte < 150 μm), onbeweeglijke, gebogen filamenten welke voornamelijk los in de vloeistof aangetroffen worden. De draden bestaan uit coccus- of staafvormige cellen welke een diameter hebben van circa 0,8 μm . Septa en insnoeringen zijn duidelijk te zien. Een schede ontbreekt. Vertakkingen en aangroei komen niet voor. Deze bacterie vormt geen S- en/of PHB-granulen. De reactie op de S-test is negatief. Gram- en Neisser-negatief.

Type 1863 vertoont enige gelijkenis met een *Streptococ*. Laatstgenoemde bacterie is echter Gram-positief.

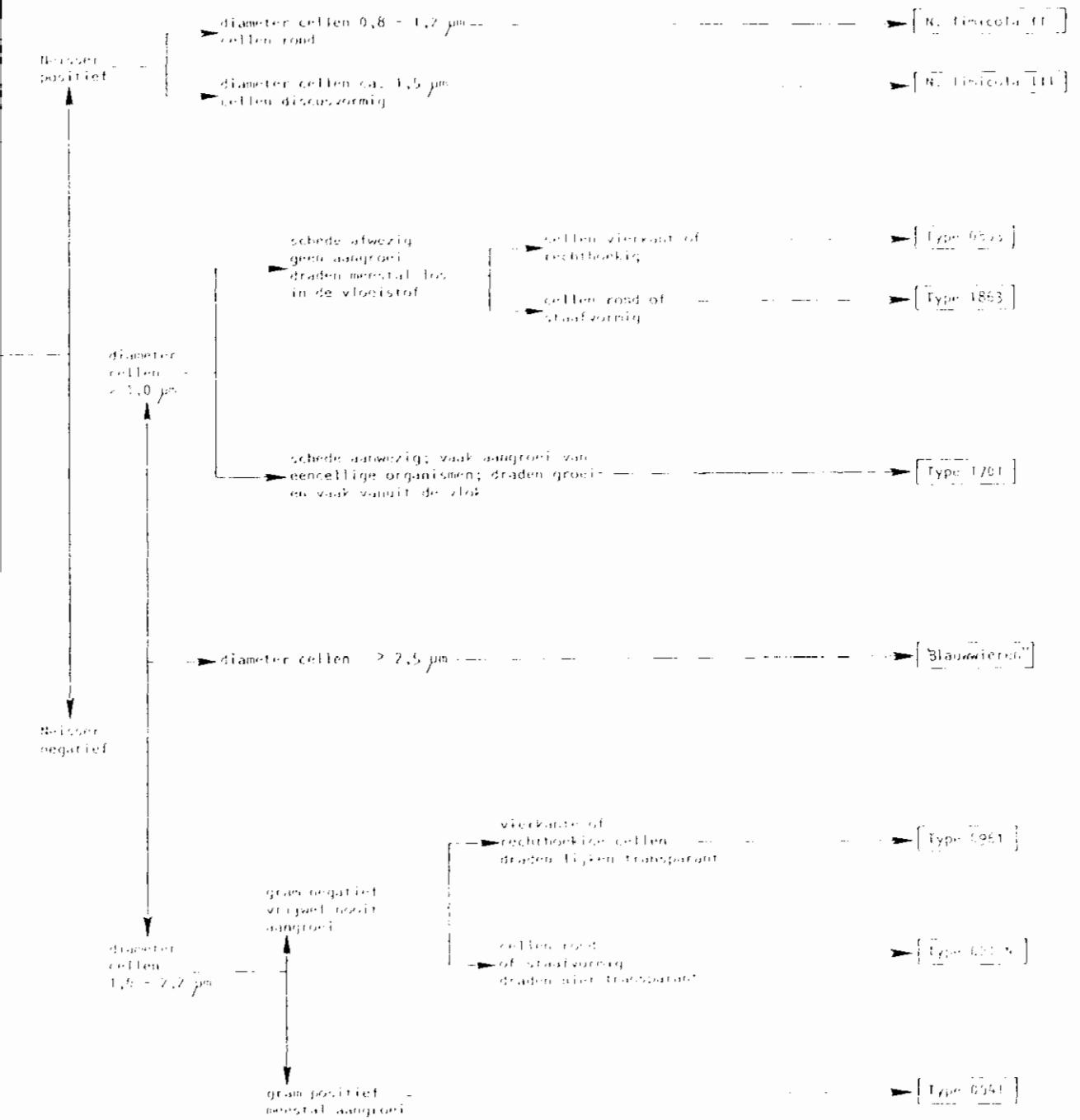
7.4 Het determinatieschema

In het determinatieschema zijn 22 draadvormige organismen opgenomen. Behalve de organismen welke regelmatig in slib aangetroffen worden zijn in het schema ook een aantal draadvormige organismen opgenomen welke op basis van enkele erg karakteristieke eigenschappen zeer eenvoudig geïdentificeerd kunnen worden. Om dit, uitvoerig geteste, schema niet al te gecompliceerd te maken zijn een zestal organismen – welke slechts incidenteel aangetroffen worden – er niet in opgenomen. Hierdoor wordt de kans op foutieve conclusies aanzienlijk verkleind.

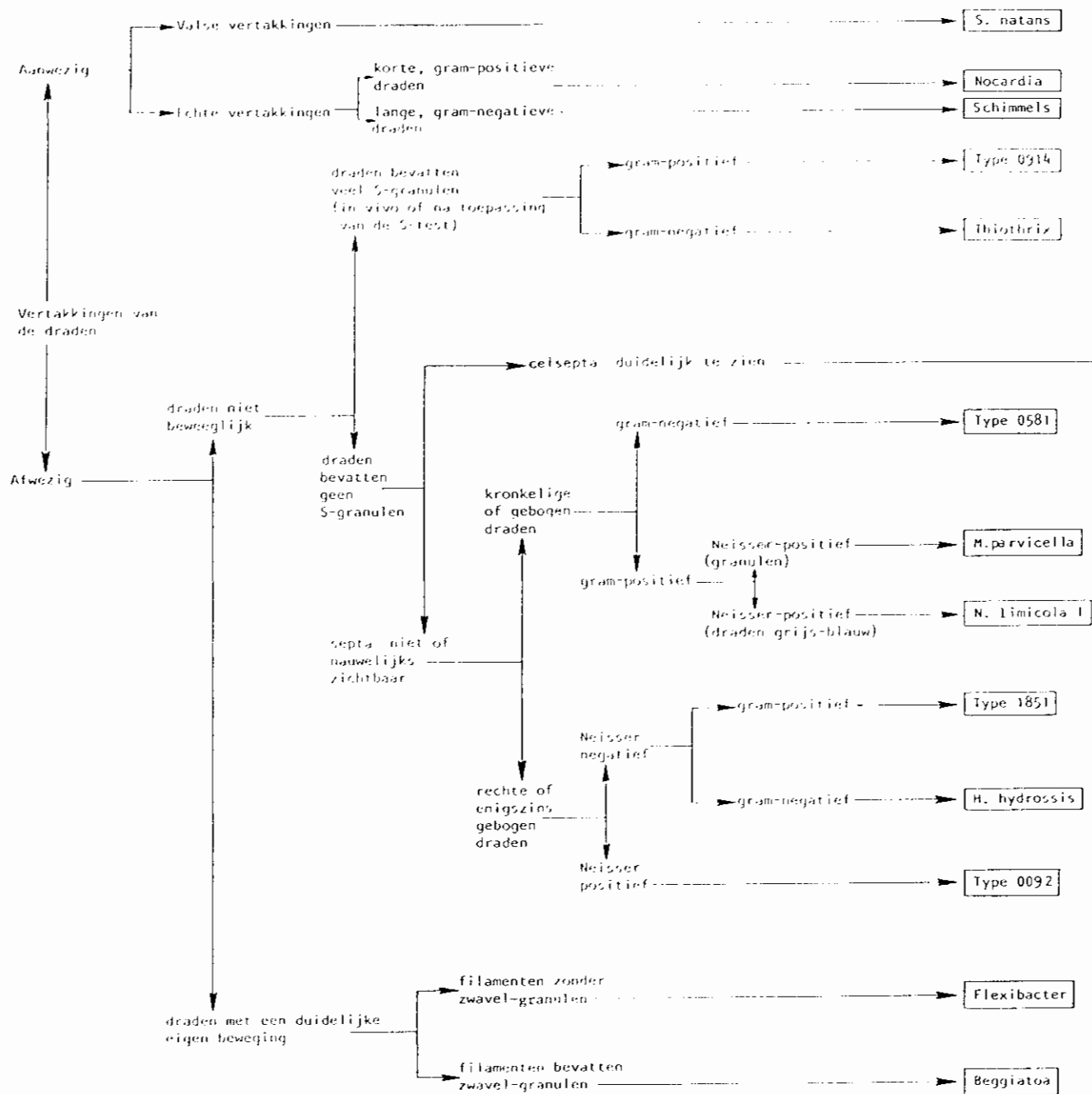
Het is belangrijk dat bij het identificeren van draadvormige micro-organismen systematisch te werk wordt gegaan. Hier wordt mee bedoeld dat bij het determineren in eerste in-

stantie een zo compleet mogelijk beeld van de verschillende morfologische kenmerken van de organismen, aanwezig in een bepaald actief-slib, samengesteld moet worden. Bij het vastleggen van de morfologische kenmerken van een bepaalde bacterie moeten verschillende draden van hetzelfde type nauwkeurig geobserveerd worden. De kans op een foutieve identificatie wordt nl. aanzienlijk vergroot indien men slechts naar één enkele draad van een bepaald type kijkt. Dit is een gevolg van het feit dat de morfologische kenmerken beïnvloed worden door de conditie van de draadvormige organismen. Vervolgens worden de 2 kleuringen en de S-test uitgevoerd. Voor het vastleggen van al deze gegevens kan gebruik gemaakt worden van de analysestaat welke als bijlage 2 in deze handleiding is opgenomen. *Pas als al de benodigde informatie verzameld is kan m.b.v. het determinatieschema vastgesteld worden wat de juiste naam (of nummer) voor een bepaald organisme is.* Vervolgens wordt nagegaan (als een soort eindcontrole) of de waargenomen kenmerken inderdaad behoren bij het betreffende organisme. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van tabel 2 waarin een samenvatting van de eigenschappen van de verschillende draadvormige organismen gegeven is. Indien uit dit vergelijken blijkt dat de waargenomen kenmerken niet corresponderen met die van het geïdentificeerde organisme, dan is er meestal een vergissing gemaakt. In zo'n geval moeten de geregistreerde kenmerken nogmaals kritisch bekeken worden teneinde de oorzaak van de foutieve identificatie op te sporen. Vaak zal er dan sprake zijn van een bepaalde eigenschap die niet met zekerheid vastgesteld kan worden. Zo is bijvoorbeeld het verschillend interpreteren van het kenmerk "duidelijk zichtbaar" van de septa een potentiële oorzaak van misverstanden.

Het nogmaals volgen van het determinatieschema zal dan meestal wel leiden tot een correcte identificatie. Incidenteel zal het niet lukken om op deze manier een bepaalde draadvormige bacterie te identificeren. Het betreft dan vrijwel altijd een bacterie die niet in het determinatieschema is opgenomen.



DETERMINATIESCHEMA VOOR DRAADVORMIGE MICROÖRGANISMEN IN ACTIEF-SLIB



FASE CONTRAST MICROSCOPIE; 700-1000X										HELDERHEID	
S. natans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	vertakkingen	
										beweeglijk	
										recht of enigszins gebogen	vorm draden
Mocardia	+										
Schimmels	+										
Type 0914											
Thiothrix	(2)										
Beggiatoa											
Flexibacter											
M. parvicella											
Type 0581											
Type 1851											
H. hydrossis											
Type 0092											
Type 0803											
Type 1863											
Type 1701	(+1)										
"Blauwieren"											
Type 0961											
Type 021 N	(2)										
N. limicola 1											
N. limicola 11											
N. limicola 111											
Type 0041											

+ = soms; ? = niet bekend; ∞ celvorm kan niet met behulp van fase-contrast waargenomen worden; 1) valse vertakkingen; 2) soms rosetten aanwezig; 3) cellen zichtbaar na oplossen van de zware bolletjes; 4) schimmels kunnen niet op deze manier gekleurd worden; 5) zwak; 6) bolletjes; 7) draden krijgen een grijs-blauwe kleur; 8) kleine bolletjes; 9) poly-B-hydroxibutyraat.

Tabel 2. Overzicht van de kenmerken van de draadvormige microörganismen die opgenomen zijn in het determinatieschema.

8 PROTOZOA, ROTIFERA EN NEMATODA IN ACTIEF-SLIB

In de meeste actief-slibben zijn naast de bacteriën welke de vlokken vormen ook diverse hogere organismen aanwezig. Deze organismen voeden zich voornamelijk met bacteriecellen welke los in de vloeistof of aan de randen van de vlokken aanwezig zijn. Ze verwijderen op deze manier veel bacteriecellen welke niet of nauwelijks "vlokgebonden" zijn en dragen zo bij tot een betere effluentkwaliteit. De aanwezigheid van dit soort organismen in actief-slib wordt dan ook positief gewaardeerd.

Tevens zegt de aanwezigheid van bepaalde soorten iets over het functioneren van het zuiveringsproces. Heel in het algemeen kan gesteld worden dat de Ciliata en Rotifera voornamelijk aangetroffen worden in niet te hoog belaste rwzi's. Bovendien moet voldoende zuurstof aanwezig zijn. In hoogbelaste rwzi's en ook in installaties met een (te) laag zuurstofgehalte komen de Flagellaten en de Rhizopoda relatief vaker voor. Voor meer informatie hieromtrent wordt verwezen naar de literatuur over dit onderwerp.

De Protozoa, Rotifera en Nematoda zijn i.h.a. veel groter dan de bacteriën; hun grootte kan variëren van 10 tot ca. 1000 µm. Bovendien hebben ze meestal een karakteristieke vorm. Hierdoor vallen ze erg op in een microscopisch preparaat. In actief slib zijn door een aantal onderzoekers enkele honderden verschillende typen waargenomen. Het correct identificeren van deze organismen is echter nogal lastig en vereist een grondige kennis van deze materie. Eén en ander valt buiten de doelstelling van deze handleiding. Hier wordt daarom volstaan met een korte beschrijving van een aantal soorten welke regelmatig in actief slib aangetroffen worden. Tevens zijn bij de beschrijving tekeningen en foto's (voor zover beschikbaar) van de verschillende typen opgenomen.

Indien men in een actief-slib het aantal aanwezige cellen van een bepaald type wil vastleggen, dan kan dit door middel van een telling gebeuren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een telkamertje.

8.1 Protozoa

De groep van de Protozoa wordt onderverdeeld in de Ciliata, Flagellaten, Rhizopoda en Actinopoda. Deze subgroepen zullen in de volgende paragrafen achtereenvolgens besproken worden.

8.1.1 Ciliata

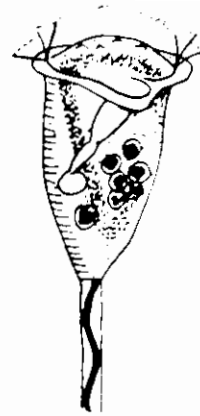
De Ciliata worden gekenmerkt door het feit dat hun celoppervlak, geheel of gedeeltelijk, bezet is met ciliën (= trilharen).

Rond hun mondopening zijn deze ciliën vaak op een bepaalde manier gerangschikt. Hierdoor kunnen deze Ciliaten de vloeistof in hun omgeving laten stromen. Ze "waaieren" hun voedsel (bacteriën, grote organische deeltjes) als het ware naar zich toe. Daarnaast spelen de trilharen een rol bij de beweging van de cel. Deze groep wordt weer onderverdeeld in de sessiele (= vastzittende), kruipende en vrij-zwemmende Ciliaten. Bij de sessiele Ciliaten is de cel geplaatst op een steel welke veelal aan een slibvlok vastzit. De sessiele Ciliaten kunnen zich dan ook niet verplaatsen.

I SESSIELE CILIATA

Vorticella (figuur 70)

Het lichaam, diameter 50–150 μm , is trechtervormig en geplaatst op een steel. De mondopening is omgeven door een krans van ciliën; verder zijn geen ciliën aanwezig. De steel bevat een spier waardoor het organisme zich samen kan trekken. In samengetrokken toestand doet de steel aan een kurketrekker denken (figuur 71). *Vorticella*'s zijn solitaire organismen; de stelen zijn niet vertakt en kolonies worden dan ook niet gevormd.



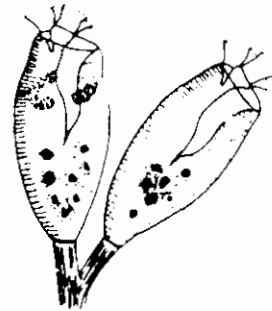
Carchesium (figuur 72)

Een trechtervormig lichaam, diameter 100–125 μm , waarbij om de mondopening weer een krans van ciliën aanwezig is. De rest van het lichaam is "kaal". De steel bevat een spier waarmee het organisme zich samen kan trekken. De stelen zijn meestal vertakt waardoor kolonies van dit type ontstaan. De spier is echter onderbroken op de plaats van de vertakking.



Opercularia (figuur 73)

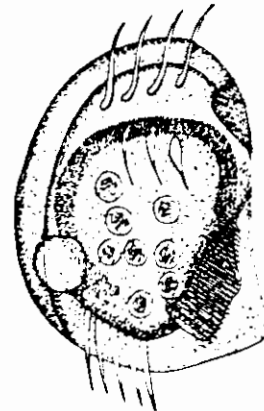
Dit organisme lijkt veel op de vertegenwoordigers van de vorige familie. De stelen zijn ook vertakt waardoor kolonies ontstaan. De steelspier ontbreekt echter bij de *Opercularia*'s waardoor dit organisme zich niet kan samentrekken. De cellen hebben een diameter van ongeveer 140 μm .



II KRUIPENDE CILIATA

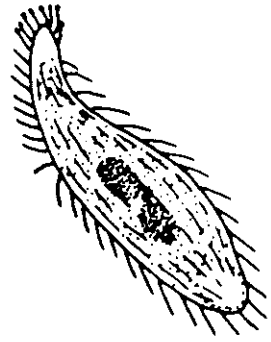
Aspidisca sp.

De cel is ovaal tot bolvormig en niet flexibel. Op de rugkant zijn 5 ribbels aanwezig. De ciliën staan niet afzonderlijk op het lichaam ingeplant, maar zijn als cirri (bundeltje ciliën welke puntig toelopen) en zogenaamde membranellen (de ciliën kleven min of meer aan elkaar) aanwezig. Zeven cirri aan de front-buikzijde, 5 of meer anaal. Aan de zijkant van het organisme is een membranell aanwezig. Een duidelijke mondopening ontbreekt. *Aspidisca* kruipt vaak met grote snelheid over het oppervlak van de vlokken. In slib worden 2 soorten aangetroffen. *Aspidisca costata* heeft een diameter van ca. 30 μm ; *Aspidisca lynceus* is ongeveer 50 μm lang.



Trachelophylum pusillum (figuur 74)

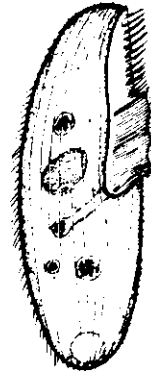
Een plat, langgerekt lichaam (lengte ca. 70 μm) dat helemaal bedekt is met ciliën. De ronde mondopening is redelijk zichtbaar en is omgeven door een aantal vrij grote, enigszins gebogen ciliën. Deze protozo glijdt betrekkelijk langzaam langs de slibvlokken.



III VRIJ-ZWEMMENDE CILIATA

Blepharisma sp.

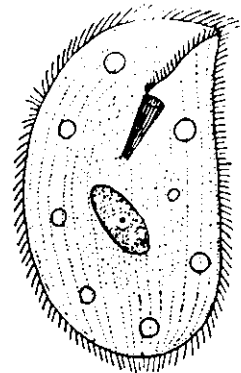
Een langwerpig ovaal, weinig flexibel organisme dat langzaam door de vloeistof beweegt. Het lichaam, lengte 180 μm , is rondom bedekt met ciliën; in de buurt van de mondopening zijn ze als membranellen aanwezig. De "mondstreek" is enigszins verzonken. De cellen van dit organisme hebben vaak een licht-rose kleur.



Chilodonella cuculatus (figuur 75)

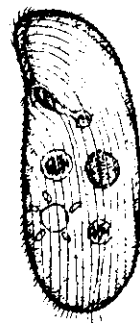
Een plat, enigszins ovaalvormig lichaam, lengte 40-125 μm . De ciliën aan de buikzijde zijn vaak moeilijk te zien; op de "rug" ontbreken ze. De ciliën op het "kopje" zijn erg opvallend. De mondopening is omgeven door een uitstulping in de vorm van een korte tubus.

Chilodonella glijdt betrekkelijk langzaam over het oppervlak van de slibvlokken.



Colpidium colpodem

De cel van dit organisme is cilindervormig; de mond en het gebied erom heen zijn duidelijk ingestulpt. De lengte van de cel bedraagt ca. 100 μm . Het organisme is bedekt met ciliën. C. colpodem beweegt i.h.a. snel door de vloeistof.



Euplotes sp.

Dit organisme vormt ovaalvormige cellen met een lengte van 80–120 μm . De buikzijde is afgeplat. Vrijstaande ciliën zijn niet aanwezig, op het celoppervlak zijn een aantal cirri aanwezig. De cirri (9 aan de voorkant en 5 aan de achterzijde) zijn i.h.a. erg duidelijk te zien.



Lionotus sp.

De cellen van dit organisme hebben de vorm van een fles. De hals en het overige gedeelte van de cel zijn ongeveer even lang, nl. 50 μm . De ciliën zijn langs de hals slechts aan één kant aanwezig.



Paramecium candatum

De cellen van dit organisme zijn sigaarvormig. Ciliën zijn rondom de cel aanwezig. De celkern is groot en i.h.a. redelijk zichtbaar. De lengte van de cel bedraagt 180–300 μm . In vergelijking met veel andere protozoën is dit dus een groot organisme.



Spirostomum sp.

Een langgerekt, snel bewegende ciliaat. Het lichaam is helemaal bedekt met ciliën. De cellen kunnen 500–900 μm lang worden. Spirostomum is de grootste ciliaat welke regelmatig in actief slib aangetroffen wordt.

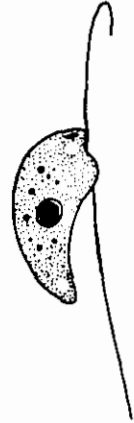


8.1.2 Flagellaten

De Flagellaten ontleen hun naam aan het bezit van 1 of meer (meestal niet meer dan 8) flagellen. Deze flagellen zijn duidelijk groter en steviger dan de trilharen en kunnen hiermee dan ook nauwelijks verwisseld worden. De flagellen dienen voor de beweging van de cel. Sommige soorten bezitten een mondopening waardoor ze hun voedsel opnemen. Andere typen zijn aangewezen op voedsel opname door de celwand. De Flagellaten zijn i.h.a. kleiner dan de Ciliaten.

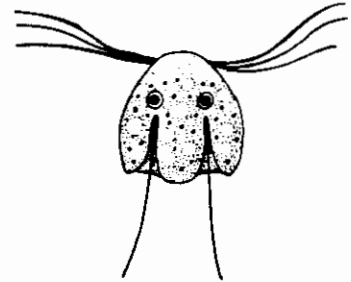
Bodo sp.

Celvorm min of meer afgerond. Twee flagellen, waarvan 1 sleepflagel en 1 zwemflagel. De flagellen staan niet op het oppervlak ingeplant maar beginnen meer naar binnen. Bodo, cellengte 10–25 μm , is gemakkelijk te herkennen aan zijn "schoksgewijze" beweging.



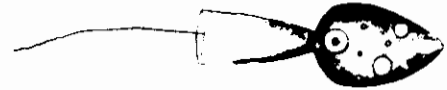
Hexamitus sp.

Aan de "voorkant" staan 2x3 flagellen ingeplant. Bovendien zijn nog 2 flagellen bij de staart aanwezig. Het platte lichaam is min of meer afgerond, de puntige staart (van Urophagus) ontbreekt. Roterende zwembeweging. De lengte van de cel bedraagt ca. 30 μm .



Monosiga sp.

De cel is bolvormig tot ovaal. Aan de "top" is een dunne kraag aanwezig waardoor de flagel naar buiten komt. Monosiga zit meestal vast aan een slibvlok. De cellen zijn 10–15 μm lang.



Pleuromonas sp.

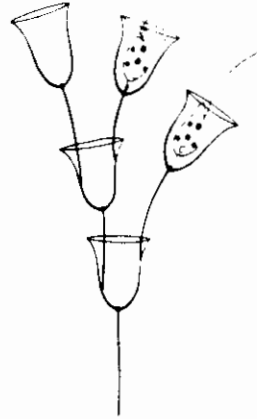
Een ronde, kleine Flagellaat, met een diameter van 6–20 μm . Op de plaats waar de twee flagellen ingeplant zijn is de celwand enigszins ingestulpt. De langste flagel zit vaak vast aan de slibvlok. Pleuromonas is gemakkelijk te herkennen aan zijn snelle, springerige manier van bewegen.



Poteriodendron sp. (figuur 76)

De cellen, lengte ca. 20 μm , zijn ovaalvormig en omgeven door een transparante trechter. Aan de onderkant van de trechter is een steeltje aanwezig waarmee het geheel vastzit aan een andere trechter.

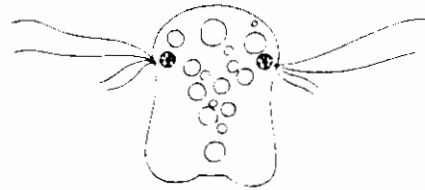
Op deze manier wordt een kolonie van *Poteriodendron* cellen gevormd. De cellen zijn voorzien van één flagel waarmee ze zich in de trechter kunnen bewegen. Ze zijn echter niet in staat om deze te verlaten.



Trepomonas sp.

Vanaf de bovenkant gezien is de cel ovaalvormig, vanaf de zijkant afgeplat. De lengte van de cellen is ca. 20 μm . Het organisme bezit 2 x 4 flagellen welke aan de zijkant ingeplant zijn.

Naast 2 lange (20 μm) zijn ook steeds 2 korte (8 μm) flagellen aanwezig. *Trepomonas* verplaatst zich door middel van een snelle, roterende zwembeweging. Tijdens het zwemmen zijn de flagellen niet te zien.

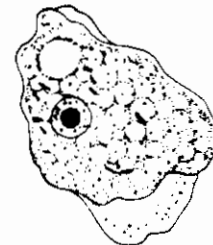


8.1.3 Rhizopoda

Deze groep organismen wordt gekarakteriseerd door hun vermogen om zich door middel van schijnvoetjes (= pseudopodiën) te verplaatsen. Deze schijnvoetjes zijn tijdelijke uitstulpingen van de celinhoud. De snelheid waarmee deze cellen zich verplaatsen is overigens meestal zo gering dat het vaak lijkt alsof ze niet bewegen.

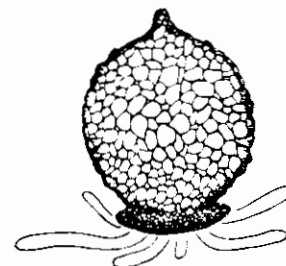
Amoeben (figuren 77 en 78)

De Amoeben zijn éencellige organismen welke niet omgeven zijn door een stevige celwand. De vorm van een Amoebe is daarom erg variabel. Hun voedsel nemen ze op door het min of meer in te sluiten. De grootte van de verschillende soorten kan variëren van 50–400 μm .



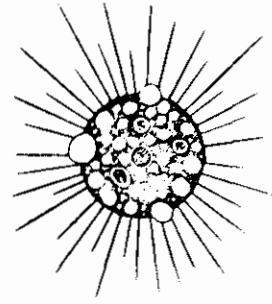
Schaalamoeben (figuur 79)

Bij deze groep Amoeben is de cel omgeven door een soort pantser. Hierin is een opening aanwezig waardoor de schijnvoetjes naar buiten kunnen komen. De vorm van de schaal (bolvormig, bekervormig etc.) hangt af van het soort. Soms is de schaal bijna transparant, oudere exemplaren hebben vaak een geel-bruine kleur. De grootte van de Schaalamoeben kan variëren van 30–200 μm .



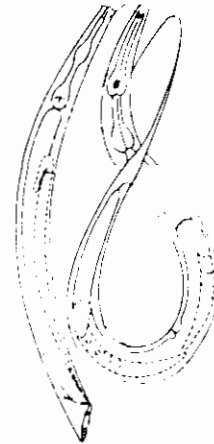
8.1.4 Actinopoda

Tot deze groep behoren de Heliozoa (= zonnediertjes). Deze organismen vormen bolvormige cellen welke omgeven zijn door naalddunne, kaarsrechte schijnvoetjes. Deze zijn in-trekbaar. Ze dienen niet voor de beweging van de cel maar hebben een functie bij het vangen van protozoën etc. Organismen welke in aanraking komen met deze schijnvoetjes worden "verlamd" en kunnen vervolgens geconsumeerd worden. De diameter van de bol kan variëren van 40–100 μm .



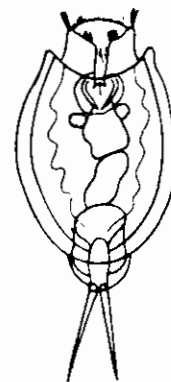
8.2 Nematoda

De Nematoda of rondwormen (figuur 80) worden gekenmerkt door hun langgerekte, cilindrische lichaam. De uiteinden van dit meercellige lichaam zijn dunner dan het centrale deel. De lengte van de Nematoda kan variëren van 500–3000 μm . Ze zijn dus veel groter dan de protozoën en kunnen daarom alleen bij lage vergrotingen bekeken worden. Omdat ze echter uiterst beweeglijk zijn is het vaak lastig om ze "in beeld" te houden.



8.3 Rotifera

De Rotifera (figuur 81) of raderdiertjes zijn grote, duidelijk beweeglijke, enigszins langgerekte, meercellige organismen. De lengte van het organisme kan variëren van 100–500 μm . Het lichaam is omgeven door een soort pantser waarin de kop en de "staart" kunnen worden teruggetrokken. Op de kop van het organisme staan enkele bundels trilharen. De staart is vrijwel altijd op een erg karakteristieke manier vertakt en speelt bovendien een belangrijke rol bij het voortbewegen van de cel. Hiermee zet het raderdiertje zich namelijk eerst vast, waarna het lichaam als het ware gestrekt wordt. Vervolgens laat de staart los, de kop blijft op zijn plaats, en het "achterlijf" wordt bijgetrokken. Deze manier van voortbewegen lijkt veel op de wijze waarop een slak zich verplaatst.



LITERATUUR

1. Curds, C. R. and H. A. Hawkes. Ecological aspects of used-water treatment; Vol. I. The organisms and their ecology. London, Academic Press, 1975.
2. Eikelboom, D. H. Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research* **9** (1975), p. 365-388.
3. Kudo, R. R. Protozoology. Springfield, U.S.A., Charles C. Thomas, 1966.
4. Pipes, W. O. Bulking of activated sludge. *Adv. in Appl. Microb.* **9** (1967), p. 185-234.
5. Pipes, W. O. Microbiology of activated sludge bulking. *Adv. in Appl. Microb.* **24** (1979), p. 85-127.
6. La Rivière, J. W. M. Microbial ecology of liquid waste treatment. In: Alexander, M. *Advances in Microbial Ecology*. New York, Plenum Press, 1977, p. 215-259.
7. Edmondson, W. T. *Fresh water biology*. New York, Wiley, 1959.

Plaats	Datum	Monsternummer

Draadvormige microörganismen ¹⁾				Kategorie:	
"Blauwwieren"		S. natans		Type 0914	
H. hydrossis		Thiothrix		Type 0961	
M. parvicella		Type 0041		Type 1701	
N. limicola I		Type 0092		Type 1851	
N. limicola II		Type 021 N			
N. limicola III		Type 0581			
Nocardia		Type 0803		Diverse typen	

Protozoën - Rotiferen - Nematoden ²⁾				Vlok morfologie	
Ciliaten		Flagellaten		Vlokstructuur	
Carchesium		Bodo		kompakt	
Opercularia		Hexamitus		onregelmatig	
Vorticella		Monosiga		open	
Aspidisca		Pleuromonas		los	
Blepharisma		Poteriodendron		agglomeraten	
Chilodonella		Trepomonas		Afmetingen vlok	
Colpidium		Amoeben		klein	
Euplotes		Schaalamoeben		middelgroot	
Lionotus		Heliozoa		groot	
Paramecium		Rotiferen		Diversiteit	
Spirostomum		Nematoden		voldoende	
Trachelophylum				nauwelijks	
1) X = dominerend; 0 = secundair				Los celmateriaal ²⁾	
2) - = vrijwel afwezig				Zoogloea-vingers ²⁾	
+ = weinig cellen of deeltjes				Spirocheten ²⁾	
++ = veel cellen of deeltjes				Grote org. vezels ²⁾	

Opmerkingen:

Bijlage 2. Analysestaat voor de determinatie van draadvormige micro-organismen in actief-slib.

Plaats	Datum	Draadvormige organismen						Opmerkingen
		1	2	3	4	5	6	
Dominerend								
Secundair								
Vertakkingen	afwezig							
	valse							
	echte							
Beweeglijkheid								
S-granulen	aanwezig							
	idem na de S-test							
Septa	zichtbaar							
	niet/slecht te zien							
Vorm draden	recht							
	gebogen							
	kronkelig							
Neisser kleuring	granulen							
	grijze cellen							
	negatief							
Gram-kleuring	positief							
	negatief							
Diameter draden	< 1,0 µm							
	1,0 - 2,2 µm							
	> 2,5 µm							
Aangroei	aanwezig							
	afwezig/gering							
Insnoeringen	duidelijk te zien							
Vorm cellen	discusvormig							
	rond							
	staafvormig							
	vierkant							
	rechthoekig							
Schede	aanwezig							

Conclusies 1 = _____
2 = _____
3 = _____
4 = _____
5 = _____
6 = _____