

Een ongewoon geval van ontwikkeling van draadvormende microorganismen in een actief-slib installatie

Regelmatig kunnen actief-slib installaties gehinderd worden in hun werking door de vorming van slecht bezinkend slib (opgezwollen slib, 'bulking sludge'). Er bestaan geen absolute methodes voor de bestrijding of het vermijden van deze moeilijkheden en er zijn slechts weinig fundamentele gegevens beschikbaar over de oorzaken van deze soms plotse verschijnselen. Dikwijls denkt men nog altijd dat alleen bacteriën van het type *Sphaerotilus* verantwoordelijk zijn. Er zijn nochtans [1] verschillende vormen van slecht bezinkend slib. In het geval van de 'fila-

speciaal met *Nodularia*, doch men kan aantonen dat het een chemoheterotroof is.

1. Studie in situ van de draadvorming

De werking van een actief-slib installatie, voor de zuivering van petro-chemische afvalwaters, werd sterk gehinderd door de vorming van slecht bezinkend slib, gedurende de zomer van 1973. De installatie bestond uit een grote voorbezinkingsruimte waarin verschillende afvalproducten een neerslag vormden (bijzonder terephtaalzuur), een voorbeluchtingstank uitgerust met oppervlaktebeluchters, vier beluchtingstanks in parallel, twee bezinkingstanks en een grote afwerkingsvijver. De afvalwaters werden aangerijkt met ammoniumsulfaat en fosforzuur juist voor ze in de beluchtingstanks geleid werden. De moeilijkheden werden ons ter kennis gebracht in de herfst. Intussen had men gepoogd, doch zonder succes, verschillende werkingsparameters te veranderen. De ganse installatie was zelfs terug op gang gebracht geweest met actief-slib afkomstig van een installatie voor de zuivering van huishoudelijke afvalwaters. Na twee weken werden de moeilijkheden terug ondervonden. Microscopisch onderzoek van het slib en de troebele effluënten duidde op de aanwezigheid van blauwwierachtige microorganismen (zie afb. 1, a, b en c). Deze organismen werden onverwacht ook teruggevonden in het voorbeluchttingsbassin, al waren de afvalwaters normaal op dit stadium praktisch vrij van stikstofverbindingen en fosfaat. Nochtans wanneer een analyse werd uitgevoerd voor deze verbindingen vond men dat de toevoer van fosfaat onbedachtzaam werd veranderd en dat fosfaat rechtstreeks werd toegevoegd in het voorbeluchttingsbekken, terwijl de stikstof nog altijd

normaal werd gevoed nadat de waters dit bekken verlaten hadden. Aangezien sommige blauwwieren stikstof uit de lucht kunnen fixeren, verstevigde de aanwezigheid van de draadvormers in dit voorbeluchttingsbekken de idee dat de organismen blauwwieren waren. De hypothese werd vooropgesteld dat de draadvormers zouden te wijten zijn aan eutrofiëring van het voorbeluchttingsbekken.

Wanneer de fosfaattoevoer weer terug normaal werd uitgevoerd verdwenen de draadvormers progressief uit het ganse systeem en verkreeg men terug slib met goede bezinkingseigenschappen. Uit deze vaststelling kon althans één definitief besluit worden gehaald: er was een duidelijke correlatie tussen de ontwikkeling van de geobserveerde draadvormers en de slechte bezinking van het slib. Verschillende maanden later werd een nieuwe ontwikkeling van dezelfde draadvormers vastgesteld. In dit geval waren ze niet te vinden in het voorbeluchttingsbekken. In deze periode was wel vastgesteld dat de fosfaatvoeding abnormaal laag was door een defect aan de doseerapparatuur. Dit viel samen met slechte COD-reducties. De draden werden dan terug opgemerkt wanneer van de lage fosfaatconcentratie terug werd overgeschakeld naar de hogere normale waarden. Bij deze nieuwe opflakking was er geen onmiddellijke verklaring voorhanden. Men lukte erin de draden uit het systeem te verwijderen door eerst de slibbelasting zeer hoog in te stellen en ze dan progressief tot normale waarden terug te brengen. Deze behandeling werd uitgevoerd op basis van de resultaten die werden verkregen op laboratoriumschaal en zoals verder wordt beschreven. Gedurende de zomer van 1974 werd een derde opflakking van de draad-



H. VERACHTERT

Laboratorium voor industriële microbiologie en biochemie, Katholieke Universiteit, Leuven



W. VISSERS

Laboratorium voor industriële microbiologie en biochemie, Katholieke Universiteit, Leuven



J. VAN DER LEYDEN

Laboratorium voor industriële microbiologie en biochemie, Katholieke Universiteit, Leuven



R. ROFFE

Laboratorium voor industriële microbiologie en biochemie, Katholieke Universiteit, Leuven

mentous bulking' is alleen het feit dat draadvormende bacteriën verantwoordelijk zijn, met zekerheid gekend. Farquhar en Boyle [2] in een overzicht van de draadvormende bacteriën, die men kan vinden in actief-slib, maken een onderscheid tussen schedevormende en niet-schedevormende bacteriën, actinomyceten en draadvormende bacillen. Van Veen [3] deelt de draadvormers in, in vijf grote groepen: gram-negatieve schedevormers, gram-negatieve onbeweglijke bacteriën, die ketens vormen, gram-negatieve bacteriën met glijdende beweging, gram-positieve onbeweglijke bacteriën, die draden vormen en bacteriën, die draden vormen alleen onder speciale voorwaarden. Hij vermeldt ook bacteriën, die enige gelijkenis vertonen met blauwwieren. In deze mededeling wensen wij een geval van opzwellend slib te beschrijven, waarbij een tot hiertoe ongekend microörganisme betrokken is. Het vertoont ook gelijkenis met blauwwieren,

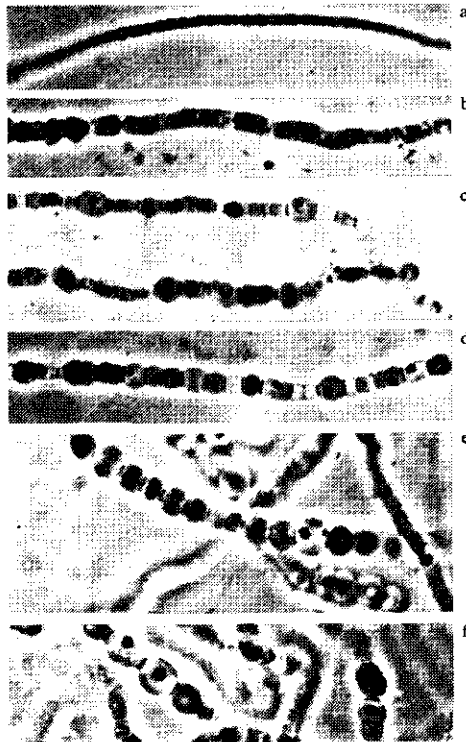
Afb. 1 - Algemeen aspect van het draadvormend micro-organisme. a: actief-slib vlokken en daarin verstrengelde draden (175 x), b: draden in de effluënten (175 x), c: 1750 x vergroting van de draden, d: oude draden (700 x).



vormers vastgesteld en werd opnieuw slecht bezinkend slib verkregen. Dit leidde ons tot verdere fundamentele studies van het draadvormende microörganisme, waarvan enkele nuttige resultaten reeds vermeld zijn onder punt 3.

2. Studie op laboratoriumschaal van de draadvorming

Bij de tweede uitbraak van de draadvormer werd het gedrag van dit organisme bestudeerd op laboratoriumschaal. Een 5 l bio-oxydatieapparaat volgens Bush [4] werd in werking gebracht met de afvalwaters van het bedrijf (6.500 mg COD/l) en het slecht bezinkend actief-slib, dat de draden bevatte. Er werd gewerkt met een toevoer van 6.500 mg COD/dag en een slibconcentratie van 4 g/l. Onmiddellijk werden COD-reducties van meer dan 95 % bekomen. De aangroei van het slib was zeer laag en bijna volledig gecompenseerd door het verlies aan organismen in de troebele effluenten. Per dag was er een verlies van ongeveer 100 mg/l droge stof, meestal draadvormers. Op deze manier werd dan gedurende verschillende dagen gewerkt zonder aftapping van actief-slib. Na meer dan tien dagen was de hoeveelheid draden aanwezig in de effluenten praktisch ongewijzigd, waaruit kon besloten worden dat het draadvormend microörganisme actief groeide in het laboratoriumsysteem. De slibbelasting werd daarna progressief opgevoerd van 0,35 tot 0,80 door dagelijkse verwijdering van een deel actief-slib. Dit leidde tot een COD-reductie van slechts 75 %. De relatieve concentratie aan draadvormers bleek echter geen observeerbare verandering te ondergaan en ook de morfologie van de draden bleef ongewijzigd. Na enkele dagen werking op hoge belasting, werd niet verder afgetapt zodat de slibconcentratie terug waarden van 4 g/l bereikte. Nu was er een drastische verandering waar te nemen in de morfologie van de draden. Zij werden dikker en vele spore-achtige structuren werden gevonden. Dit kan men volgen in afb. 2. Simultaan verkreeg men een betere slibbezinking. Na ongeveer 15 dagen werden weer COD-reducties van meer dan 95% vastgesteld. Het systeem werd vanaf dan geregeld door dagelijkse verwijdering van 250 ml fermentinhoud. Dit leidde tot volledige verwijdering van het draadvormende organisme. Het is mogelijk dat de veranderingen van hoge slibbelasting naar lage slibbelasting, door het toelaten van slibaangroei, geleid heeft naar een snellere ontwikkeling van unicellulaire microörganismen, die dan de competitief werden voor de draadvormer. Deze zelfde verandering heeft ook in de industriële installatie geleid naar verwijdering van de draden. Dit gaf echter geen antwoord op de vragen



Afb. 2 - Verandering in de morfologie van de draden: a: begin van differentiatie, b: verdikking van de draden, c: optreden van de spore-achtige structuren, d, e en f: sommige draden zijn volledig gedifferentieerd tot spore-achtige structuren. Vergroting 1750 x. De monsters werden op de voorwerpplaatjes aan de lucht gedroogd en dan behandeld met een druppel lactophenolblauw oplossing.

Afb. 3 - a: micrograph van afgezonderde koloniën van het draadvormend organisme waarbij de typische 'vingerafdrukken-structuren' te zien zijn (250 x), b: micrograph van draden na groei op vaste media (1250 x).



naar de oorsprong en de eigenschappen van het draadvormend organisme. Aangezien dit organisme zich later terug ontwikkelde in het systeem en daar nog steeds aanwezig is werd besloten over te gaan naar zuivering en identificatie.

3. Afzondering en zuivering van het draadvormende micro-organisme

Inenting van groeimedia bestemd voor de cultuur van blauwwieren (medium van Gerloff [5] of van Wieringa [6]) met monsters van de actief-slib installatie of van de effluenten, leidde niet tot groei van draadvormers, zelfs niet na vier weken van incubatie onder belichting. Dit was de eerste indicatie dat het organisme geen blauwwier zou zijn, al waren alle morfologische karakteristieken (zie later) sterk aanverwant met deze van de blauwwieren.

Het organisme werd dan gezuiverd als volgt: monsters van het effluent werden gefilterd door membraanfilters (Gelman GA-6) en de draden op de filter werden herhaaldelijk gewassen met steriel water. Een suspensie van gewassen cellen werd dan uitgestreken op nutrient-agar platen en deze werden in incubatie gebracht op 28°C.

Onregelmatige, grijsachtige, koloniën kwamen tot ontwikkeling. Deze bestonden uit draden en unicellulaire bacteriën. Zij werden verder gezuiverd door herhaaldelijk uitstrijken op nutrient-agar platen en op een vast medium dat gistextract en acetaat bevatte (het *Thiothrix* medium van Burton [7]). Zo werden uiteindelijk koloniën bekomen, zonder unicellulaire bacteriën. Deze koloniën vertoonden typische structuren in de vorm van vingerafdrukken (finger-print-like structures) zoals men vroeger vermeldde voor *Leucothrix* [8]. Dit ziet men in afb. 3. Grotere koloniën werden nog bekomen op het *Vitreoscilla* medium van Pringsheim [9]. Zij waren dik en bruin van kleur. Identische koloniën werden bekomen met of zonder licht. Onverwacht werd er praktisch geen groei vastgesteld in vloeibare media: nutrient-bouillon of *Thiothrix*-bouillon. Alleen bij toevoeging van zeer kleine hoeveelheden agar (0,05 %) trad groei op. In *Thiothrix* medium vormden de draden dan een grote slijmachtige massa, die in haar geheel met de entnaald kon opgepikt worden. In het *Vitreoscilla* medium met 0,05 % agar was de groei nog beter en werden meerdere kleine slijmachtige vlokken gevormd. In de vlokken kon men draden vinden, die twee aan twee verstrengeld waren zoals bij een koord. In deze gevallen was de invloed van agar blijkbaar toe te schrijven aan een verhoging van de viscositeit van de media. Verschillende types van commerciële agar gaven dezelfde resultaten en op vaste media was er geen hydrolyse van de agar vast te stellen. Similaire resultaten in vloeibare me-

dia werden gevonden bij belichting of zonder belichting, in schudkulturen of in stationaire kulturen.

4. Karakteristieken van het draadvormend micro-organisme

Draden uit de effluenten van de installatie of draden bekomen in reinkultuur hadden de volgende karakteristieken gemeenschappelijk: hun gemiddelde diameter was slechts van 3 tot 6 μm , maar ze werden tot meer dan 1 mm lang. De draden waren opgebouwd uit ketens van cellen, ongeveer twee maal zo breed als lang, en allen van simi-laire vorm en afmetingen wanneer jonge draden onderzocht werden. In het bio-oxydatieapparaat vormden de draden vele spore-achtige structuren terwijl de draden bekomen in de reinkultuur dikwijls onregelmatige cellen vormden. Bovendien werden hier dikwijls draden bekomen waar over een bepaalde lengte geen septa zichtbaar waren. In deze delen werden dan vele granulen waargenomen. De draden eindigden niet of nauwelijks in punten. *In vivo* kwamen zij voor in vrije vorm of verstrengeld in de vlokken van actief-slib. In reinkultuur, in media met 0,05 % agar, zaten de draden bij elkaar in slijmachtige massa's. Er werden met kleuringstechnieken geen scheden aangetoond. Vele van deze karakteristieken leiden naar blauwwieren zoals *Nodularia* [10], doch aangezien er geen autotrophe groei werd vastgesteld, werd besloten dat het draadvormend microorganisme een chemoheterotrophe was. Er werd ook, na groei, in het *Thiothrix* medium, geen chlorophyl a gevonden volgens de methoden beschreven in de 'Standard Methods' [11]. Draden uit het actief-slib waren ook niet in staat acetyleen te reduceren tot ethyleen, en dit wijst erop dat ze ook geen stikstof uit de atmosfeer kunnen fixeren. Een gramkleuring (crystalviolet-safranine methode) duidde aan dat de draden gram-negatief waren. De granulen, gevonden in sommige delen van de draden in reinkultuur, kleurden als gram-positieve korrels. De draden waren niet zuurvast, vormden geen endosporen en bevatten metachromatische korrels, alleen na groei in een fosfaatrijk medium, zoals de afvalwaters zelf. Celwanden van jonge draden kleurden zeer goed in het rood met cetylpyridiniumchloride en Congo Rood. Een druppel suspensie van draden werd gemengd met een druppel van een oplossing van Janus Groen (20 mg/l water).

5. Discussie

De vorming van opgezwollen slib, als gevolg van de ontwikkeling van microorganismen die groeien onder draadvorm, is een wel gekend en relatief frekwent voorkomend verschijnsel. Voor zover we weten is er ech-

ter geen geval bekend waar dit verschijnsel zich voordoet in afvalwaters die praktisch vrij zijn van complexe biologische verbindingen. In de onderzochte situatie bevatten de afvalwaters alleen aromatische zuren zoals terephtaalzuur en isophtaalzuur, kleine hoeveelheden azijnzuur en methanol en sporen mangaan- en cobaltzouten. De stikstofbron was ammoniumsulfaat. De eerste vaststellingen wezen op aanwezigheid van blauwwieren maar deze hypothese kon niet weerhouden worden. Het wordt dan ook moeilijk te verklaren waarom het organisme groeide in het voorbeluchtingsbekken, dat praktisch geen stikstof bevatte, tenzij de altijd aanwezige sporen voldoende waren. Het is ook niet uitgemaakt waarom het organisme zo goed groeit in deze industriële afvalwaters. Door de afzondering en de zuivering van het draadvormende blauwwierachtig microorganisme kan nu verder onderzoek worden verricht i.v.m. de voedingsbehoeften van het organisme en zijn gevoeligheid tegenover verscheidene chemische verbindingen. Op basis daarvan kunnen misschien methodes worden voorgesteld voor de verdere bestrijding van zijn ontwikkeling in het industrieel systeem. Van een meer fundamenteel standpunt uit zal de verdere studie van dit ongewoon microorganisme hopelijk kunnen bijdragen tot een beter begrip van de complexe microbiologische omvormingen die leiden tot de zuivering van afvalwater.

6. Dankwoord

De schrijvers wensen dr. Hennebert (Universiteit van Louvain-la-Neuve) te bedanken voor de fotografische opnamen en dr. Vlassak (Universiteit van Leuven) voor de experimenten i.v.m. mogelijke stikstof-fixering.

Literatuur

1. Pipes, W. C., *Bulking of activated-sludge*. Adv. appl. Microbiol., 8, 185 (1967).
2. Farquhar, G. J. and Boyle, W. C., *Identification of filamentous microorganisms in activated-sludge*. J. Water Poll. Control. Fed., 43, 604 (1971).
3. Veen, W. L. van, *Bacteriology of activated-sludge, in particular the filamentous bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 39, 189 (1973).
4. Bush, A. W., *Theory and design of bench-scale units for biological oxidation studies*. Water and Sewage Works, 106, 254 (1954).
5. Gerloff, G. C., Fitzgerald, G. P. and Skoog, P., *The isolation, purification and culture of blue-green algae*. Amer. J. Botany, 37, 216 (1950).
6. Wieringa, K. T., *A new method for obtaining bacteria-free cultures of blue-green algae*. Antonie van Leeuwenhoek, 34, 54 (1968).
7. Morita, R. Y. and Burton, S. D., in Norris, J. R. and Ribbons, D. W. *Methods in microbiology*. Academic Press, London, Vol. 3 A, 126 (1970).
8. Pringsheim, E. G., *Observations on Leucothrix mucor and Leucothrix cohaerens nov. spec.* Bacteriol. Rev., 21, 69 (1957).
9. Pringsheim, E. G., *The bacterial genus Lineola*. J. gen. Microbiol., 4, 198 (1950).
10. Jones, W. E., *A key to the genera of british seaweeds*. Field Studies, 1, 1 (1962).
11. A.P.H.A. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Amer. Public Health Assoc., Washington (1971).