

NN31050.86-06

1986-06

stora

Ontwikkeling van een
algengroei-potentietoets
voor
oppervlaktewater en afvalwater

WILHELMUS
STARRINGEBOUW

1.2.2.1.1.1.1

stora

postbus 414, 2280 AK rijswijk



070-99.11.33

stichting toegepast onderzoek reiniging afvalwater

Ontwikkeling van een
algengroeiopotentietoets
voor
oppervlaktewater en afvalwater



0000 0580 8692

14 JUN 1988

Inhoud

	Inhoud	I - III
	Ten geleide	V
1	SAMENVATTING	1 - 2
2	INLEIDING	3 - 5
3	VOORBEHANDELING	6 - 10
3.1	Inleiding	6 - 7
3.2	Experimenteel	7 - 8
3.3	Resultaten en bespreking	8 - 10
4	INVLOED VAN DE VOORBEHANDELING OP DE FYSISCH-CHEMISCHE SAMENSTELLING VAN HET TE ONDERZOEKEN WATER	11 - 29
4.1	Inleiding	11 - 12
4.2	Monsters met anorganische verbindingen	12 - 15
4.2.1	<i>experimenteel</i>	12 - 14
4.2.2	<i>resultaten en discussie</i>	14 - 15
4.3	Monsters met organische verbindingen	15 - 17
4.3.1	<i>experimenteel</i>	15 - 16
4.3.2	<i>resultaten en bespreking</i>	16 - 17
4.4	Vrijkomen van nutriënten uit algen en bacteriën	17 - 18
4.4.1	<i>experimenteel</i>	17 - 18
4.4.2	<i>resultaten en bespreking</i>	18 - 20
4.5	Sporenelementen	20 - 22
4.5.1	<i>experimenteel</i>	20 - 21
4.5.2	<i>resultaten en bespreking</i>	21 - 22
4.6	Effecten van pH-verlaging en verdunning	22 - 28
4.6.1	<i>pH-verlaging</i>	23 - 26
4.6.2	<i>verdunning</i>	26 - 28
4.7	Eindconclusies voorbehandeling	28 - 29
5	KEUZE TOETSALG	30 - 35
5.1	Inleiding	30
5.2	Reactie op variaties in het nutriëntengehalte	30 - 34
5.2.1	<i>experimenteel</i>	30 - 31
5.2.2	<i>stikstofverbindingen</i>	31 - 32
5.2.3	<i>fosforverbindingen</i>	32 - 34
5.3	Representativiteit voor het Nederlandse oppervlakte- water	34 - 35

5.3.1	<i>resultaten</i>	34 - 35
5.4	Eindconclusies keuze toetsalg	35
6	KWEEKOMSTANDIGHEDEN	36 - 47
6.1	Inleiding	36
6.2	Spectrale samenstelling van het licht	36 - 37
6.2.1	<i>experimenteel</i>	36
6.2.2	<i>resultaten en bespreking</i>	37
6.3	CO ₂ -voorziening in batchcultures van algen	38 - 47
6.3.1	<i>inleiding</i>	38
6.3.2	<i>invloed menging</i>	38 - 41
6.3.3	<i>verhouding tussen vloeistofoppervlak en volume</i>	41 - 43
6.3.4	<i>invloed afsluiting van de kweekkolven</i>	43 - 45
6.3.5	<i>de beginconcentratie aan anorganisch koolstof</i>	45 - 47
6.4	Eindconclusies kweekomstandigheden	47
7	ENT EN ENTVOORBEREIDING	48 - 51
7.1	Nutriëntengehalte van het kweekmedium	48 - 51
7.1.1	<i>inleiding</i>	48
7.1.2	<i>experimenteel</i>	48 - 49
7.1.3	<i>resultaten en bespreking</i>	49 - 50
7.1.4	<i>invloed van de verschillende media in de voorcultuur op de reactie van de algen in de algenroei-potentietoets</i>	50 - 51
7.2	Entconcentratie	51
7.3	Steriliteit	51
7.4	Eindconclusies ent en entvoorbereiding	51
8	METHODEN OM BIOMASSA TE METEN	52 - 55
8.1	Inleiding	52
8.2	Drooggewicht	52 - 53
8.2.1	<i>experimenteel</i>	52
8.2.2	<i>resultaten en bespreking</i>	52 - 53
8.3	Optische dichtheid	53
8.3.1	<i>experimenteel</i>	53
8.4	Chlorofyl-a-gehalte	53 - 54
8.4.1	<i>experimenteel</i>	54
8.4.2	<i>resultaten en bespreking</i>	54
8.5	Betrouwbaarheid	54 - 55
8.5.1	<i>experimenteel</i>	55
8.5.2	<i>resultaten en bespreking</i>	55
8.6	Eindconclusie methoden om de biomassa te meten	55

9	STATISTISCHE VERWERKING VAN DE GEGEVENS	56 - 58
9.1	Inleiding	56
9.2	Experimenteel	56
9.3	Resultaten en bespreking	56 - 58
9.3.1	<i>maximale biomasseparameters</i>	56 - 57
9.3.2	<i>significantiegrenzen</i>	57 - 58
9.4	Eindconclusies statistische verwerking van de gegevens	58
10	VOORLOPIG VOORSCHRIFT, PRAKTIJKSITUATIES EN RINGONDERZOEK	- 59 - 63
10.1	Inleiding	59
10.2	Voorlopig voorschrift voor het uitvoeren van algengroei-potentietoetsen	59
10.3	Praktijksituaties	59 - 61
10.3.1	<i>experimenteel</i>	59 - 60
10.3.2	<i>resultaten en bespreking</i>	60 - 61
10.4	Ringonderzoek	61 - 63
10.4.1	<i>experimenteel</i>	61
10.4.2	<i>resultaten en bespreking</i>	62 - 63
10.5	Eindconclusies	63
11	LITERATUUR	64 - 66
	Bijlage 1	69
	2	70
	3	71 - 77

Ten geleide

De potentiële algengroei als resultante van diverse factoren kan informatie verschaffen over de eutrofiëring van oppervlaktewater en de invloed daarvan op de biocoenose.

Het thans voorliggende rapport beschrijft de ontwikkeling van een methode om onder gestandaardiseerde omstandigheden in het laboratorium de maximale concentratie vast te kunnen stellen van de voor het Nederlandse oppervlaktewater representatieve toetsalg *Scenedesmus quadricauda* ("de algengroeiopotentie van een water").

Het rapport mondt uit in een voorlopig voorschrift voor een algengroeiopotentietoets, dat op ruimere schaal nog in de praktijk getoetst dient te worden.

Het onderzoek werd door het algemeen bestuur van de STORA op advies van de OAC* opgedragen aan de Vakgroep Gezondheidstechniek en Waterbeheersing van de Afdeling der Civiele Techniek TU Delft en namens de STORA begeleid door een commissie bestaande uit drs. F.A. Kouwe (voorzitter), ir. C. Jol en dr. J. Moed.

Rijswijk, december 1986.

De directeur van de STORA

drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff

*

De Onderzoekadviescommissie die tot dit project adviseerde, bestond uit:
prof.ir. A.C.J. Koot (voorzitter), drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff (secretaris) en dr.ir. H.J. Eggink, prof.dr. P.G. Fohr, ir. R. Karper, dr. E.J.M. Kobus, ir. A.A. van der Koppel, ir. C.H. Kuggeleijn, ir. J.S. Kuyper, ir. H.A. Meijer, ir. H.M.J. Scheltinga, dr.ir. D.W. Scholte Ubing, ir. J. van Selm en drs. A.A. Wismeijer (leden)

SAMENVATTING

Onder de algengroei-potentie (AGP) van een water, wordt de maximale opbrengst van een toetsalg verstaan, verkregen onder duidelijk omschreven laboratoriumomstandigheden.

Dit onderzoek beschrijft de ontwikkeling van een methode om de AGP van een water te bepalen.

Om de in de watermonsters reeds aanwezige organismen te verwijderen of te inactiveren dienen de monsters een voorbehandeling te ondergaan.

Uit de onderzochte voorbehandelingsmethoden komen autoclaveren en UV-bestraling als meest geschikt naar voren.

Voorbehandeling heeft invloed op de fysisch-chemische samenstelling van de monsters. Tijdens het autoclaveren kunnen neerslagen in monsters met een hoge pH bij hoge calcium- en/of fosfaatconcentraties worden gevormd. Sporenelementen kunnen hierbij worden gecoprecipiteerd. De vorming van een dergelijk neerslag kan voorkomen worden door pH-verlaging of verdunning van de monsters. Extrapolatie van de resultaten, verkregen met aangezuurde monsters naar monsters met de uitgangspH, bleek niet mogelijk. Bij verdunning van praktijkmonsters (effluent en oppervlaktewater) tot een fosforgehalte lager dan 0,50 mg P/l was deze extrapolatie wel mogelijk. Van de nutriënten, gebonden in algen en bacteriën, komt bij deze methode alleen fosfaat in belangrijke mate vrij.

Neerslagen worden niet gevormd bij UV-bestraling. Nadelen hierbij zijn echter de lange bestralingsduur voor sterilisatie van de monsters en de grote kans op het verlies van nutriënten door bezinking van deeltjes.

Daarom verdient autoclaveren de voorkeur, mede omdat hiermee snel grote volumina kunnen worden behandeld.

Scenedesmus quadricauda bleek de meest geschikte toetsalg: gevoelig voor veranderingen in het nutriëntengehalte en representatief voor Nederlands oppervlaktewater.

Uit vergelijkend onderzoek met vier kweekmedia bleek het medium Z8, op 10% van de voorgeschreven sterkte goed te voldoen. De samenstelling leidt niet tot "luxury uptake", de opbrengst aan algen is groot genoeg om het volume van de ent beperkt te houden en de exponentiële groeifase waarin de ent aan de voorcultuur wordt onttrokken, heeft een voldoende lengte en onderscheidt zich duidelijk van de stationaire fase.

Om de resultaten van de AGP-toetsen onderling en over een langere periode te kunnen vergelijken, zijn de kweekomstandigheden gestandaardiseerd:

- temperatuur op $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- continue belichting, 24 W/m^2 met TL-33 lampen;
- continue menging;
- kweekkolven (erlenmeyers) voor slechts 20% van het volume vullen en overkappen met bekerglazen voor een voldoende CO_2 -toevoer.

De groei van de algen wordt gevolgd met de optische dichtheid bij een golflengte van 750 nm (OD_{750}), een maat voor het biovolume. Deze grootte wordt - in tegenstelling tot chlorofyl - niet beïnvloed door de fysiologische toestand van de alg. De biomassa van de cultuur wordt bepaald door middel van het drooggewicht. De proef wordt daartoe op een duidelijk omschreven moment in de stationaire fase van de cultuur afgebroken.

Om de betrouwbaarheid van de toets te bepalen is een aantal praktijkmonsters in achtvoud uitgevoerd; de uiteindelijke keuze voor proeven in viervoud is een compromis tussen de betrouwbaarheid van de uitkomsten en de hoeveelheid te verrichten werk.

Op grond van de verkregen resultaten is een voorlopig voorschrift voor de algengroeipotentiëtoets opgesteld. Dit voorschrift is in een aantal praktijksituaties en in een ringonderzoek getest.

De mate van eutrofiëring van een water wordt uitgedrukt in parameters als chlorofyl-a, stikstof- en/of fosforverbindingen of de verhouding van deze componenten. De invloed van de eutrofiëring op de biocoenose in een water is hieruit slechts ten dele af te leiden. Zo behoeft een water met een hoog stikstof- of fosforgehalte niet altijd een hoge algenbiomassa te vertonen. Er zijn nog andere factoren die een rol spelen, zoals het seizoen, klimatologische-, hydrologische omstandigheden en biologische factoren zoals het afgrazen door zoöplankton en infecties.

Een beoordeling van de mate van eutrofiëring van een water aan de hand van een biologische parameter waaruit de invloed op de biocoenose wel valt af te leiden, is daarom van wezenlijke betekenis. Bij de keuze van zo'n parameter zou men gebruik kunnen maken van de algen in een systeem, omdat de invloed van de eutrofiëring zich het eerst weerspiegelt in hun biomassa en samenstelling; het chlorofylgehalte wordt vaak gebruikt als kwantitatieve maat voor de algenconcentratie in een water. Daar niet alleen nutriënten de concentratie van algen bepalen, maar ook andere factoren, zoals de hierboven vermelde, geeft het chlorofylgehalte slechts informatie over de actuele algenhoeveelheid. Voor het waterbeheer is daarom informatie over de potentiële algengroei van groot belang.

De maximale concentratie van een toetsalg in het te beoordelen water onder duidelijk omschreven laboratoriumomstandigheden - de algengroei-potentie (AGP) van een water - blijkt een goede parameter in het eutrofiëringsonderzoek^{29,34}. Een dergelijke methode toegepast op oppervlaktewater en effluent van rioolwaterzuiveringsinrichtingen geeft informatie over de invloed van beheersmaatregelen zoals het lozen van afvalwater of voedselrijk polderwater en het defosfateren en/of denitrificeren van te lozen water. Door middel van deze bepaling is het ook mogelijk de mate van eutrofiëring van gelijke typen wateren, zoals polder- of boezemwateren of verschillende panden van een kanaal, onderling te vergelijken en te waarderen.

Met deze toets kan men de AGP van een water bepalen, alsmede de factor die de groei van de algen in de cultuur beperkt heeft. Deze resultaten mogen evenwel niet zonder meer naar de natuurlijke omstandigheden vertaald worden, omdat het in de cultuur gebruikte watermonster een momentopname is van het natuurlijke water waarin doorlopend veranderingen in het gehalte aan nutriënten plaatsvinden, o.a. door aanvoer vanuit de bodem. Deze factoren kunnen niet bij de extrapolatie van de gegevens onder laboratoriumomstandigheden naar de natuurlijke omstandigheden betrokken worden. Het bepalen van de groeibeperkende factor in de natuurlijke situatie is met deze toets niet direkt mogelijk¹¹.

Werkgroep 390 05 800 van het Nederlands Normalisatie Instituut (de ad-hoc werkgroep Eutrofiëringstoets), heeft de toetsen, zoals deze in het binnen- en buitenland worden uitgevoerd, geïnventariseerd en onderling vergeleken. Op grond van deze vergelijking ging de voorkeur uit naar het werken met één toetsalg, afkomstig uit een laboratoriumcultuur³.

Van de toetsen, gebaseerd op dit principe, zijn vervolgens verschillende aspecten in beschouwing genomen. Op grond van de gegevens, verkregen uit reeds verricht onderzoek of uit de literatuur, is geconcludeerd dat op een aantal punten al voldoende kennis beschikbaar was. In dit rapport wordt het onderzoek gerapporteerd dat is uitgevoerd om voor de overige punten de nog ontbrekende informatie te verkrijgen. Deze punten zijn: wijze van voorbehandeling van het te toetsen water, keuze toetsalg, ent en entvoorbereiding en het meten van de biomassa. Het onderzoek heeft geresulteerd in de ontwikkeling van een voorlopig voorschrift voor de toets.

De hoofdstukken 3 en 4 behandelen de voorbehandelingsmethoden waarmee de organismen, die van nature in het te toetsen water voorkomen, verwijderd of geïnactiveerd worden. Dit is noodzakelijk als men alleen de reactie van de toetsalg wil weten. De behandeling mag evenwel geen invloed hebben op de fysisch-chemische samenstelling van het water. Aan de hand van synthetische monsters samengesteld uit organische en anorganische verbindingen is dit onderzocht. Ook is de mate waarin nutriënten vrijkomen uit algen en bacteriën bepaald.

De keuze van de algensoort die als toetsalg gebruikt wordt, is beperkt tot de groenalgen (chlorophyceae). Het onderzoek heeft zich gericht op de eisen dat een toetsalg een snelle en duidelijke reactie moet vertonen bij variaties in het nutriëntengehalte van het water en representatief moet zijn voor het Nederlandse oppervlaktewater (hoofdstuk 5).

Om de resultaten van de toets onderling te kunnen vergelijken is het noodzakelijk de kweekomstandigheden nauwkeurig vast te leggen. Bij het kweken in batch-cultures kan een tekort aan CO_2 ontstaan. Als de toevoer kleiner is dan de opname door de algen wordt het carbonaat-evenwicht verstoord en bestaat de mogelijkheid dat de pH oploopt tot hoge waarden. De CO_2 -toevoer wordt o.a. beïnvloed door de wijze van mengen, de verhouding vloeistofoppervlak en volume, en de wijze van afsluiting van de kweekkolven (hoofdstuk 6).

Niet alleen de externe omstandigheden (kweekomstandigheden) kunnen het resultaat beïnvloeden, ook interne factoren in de algen. Zo moet men voorkomen dat de algen in het begin van de toets in eerste instantie groeien door de voedingsstoffen die ze in de voorcultuur extra hebben opgeslagen (hoofdstuk 7).

Met de algengroei-potentietoets wordt de maximale opbrengst aan algen in het te beoordelen water bepaald. Van belang is de grootte waarmee deze groeipotentie wordt bepaald en de te gebruiken meetmethoden. De te meten grootheden moeten een maat zijn voor de hoeveelheid algen en niet afhankelijk zijn van de fysiologische toestand van de cel (hoofdstuk 8).

Voor de evaluatie van de met deze toets verkregen gegevens (hoofdstuk 10) moet de betrouwbaarheid bekend zijn. Deze kan bepaald worden door de toets uit te voeren met praktijkmonsters. Aan de hand van de betrouwbaarheidsgegevens kan worden berekend hoeveel replica's er moeten worden ingezet (hoofdstuk 9).

Als resultaat van het onderzoek is een voorlopig voorschrift voor standaardisatie van de toets opgesteld. De toetsing van dit voorschrift aan de hand van praktijkmonsters heeft slechts in beperkte mate kunnen plaatsvinden. Deze toetsing en die tussen enkele laboratoria onderling heeft zodanige resultaten opgeleverd dat, ondanks

geconstateerde verschillen, van dit voorschrift voorlopig gebruik gemaakt kan worden.

Het voorlopig voorschrift moet nog op ruimere schaal in de praktijk getoetst worden op zijn bruikbaarheid. Deze toetsing zal duidelijkheid moeten verschaffen over de oorzaken van de nog gevonden verschillen in resultaten. Een bijstelling van het voorlopig voorschrift kan hieruit voortvloeien. De ad-hoc werkgroep Eutrofiëringstoets zal hierin een coördinerende rol spelen.

3 VOORBEHANDELLINGSMETHODEN

3.1 Inleiding

Voor het uitvoeren van een algengroei-potentietoets met een toetsalg dienen de in het monster aanwezige organismen geïnactiveerd te worden. Dit is noodzakelijk omdat deze organismen het resultaat van de toets kunnen beïnvloeden. De voorbehandeling moet geen overlevingskansen bieden aan algen en bacteriën, er mag geen verlies optreden van nutriënten en de methode moet algemeen toepasbaar zijn. Voor de sterilisatie van de monsters kunnen filtratie, autoclaveren, behandeling met ultrasoon geluid of UV-bestraling worden toegepast.

Filip en Middlebrooks⁷ passen een filtratie over een 0,45 µm membraanfilter toe als voorbehandelingsmethode. Uit hun metingen blijkt dat niet alle bacteriën uit het monster worden verwijderd. Toepassing van een membraanfilter met kleinere poriën vergroot echter de kans dat naast bacteriën en algen ook particulier gebonden nutriënten (met name fosfaten) uit het monster worden verwijderd. Het eigen onderzoek beperkt zich tot de bepaling van de faktor waarmee het aantal bacteriën in effluent wordt gereduceerd door filtratie over een membraanfilter van 0,45 µm.

In de procedure voor de algengroei-potentietoets van de E.P.A.²⁰ wordt voor autoclaveren bij 121°C en 1,1 kg/cm² een tijdsduur voorgeschreven van 30 minuten of 10 minuten per liter monster. Controlemetingen tonen aan dat autoclaveren met een tijdsduur van 20 minuten voldoende is voor de inactivering van algen en bacteriën in effluent.

Over de omstandigheden waaronder steriele watermonsters worden verkregen door een behandeling met ultrasone geluidsgolven zijn in de literatuur weinig gegevens te vinden. Voor desinfectie wordt gebruik gemaakt van geluidsgolven met een zeer hoge frequentie (400 - 1000 Hz), vermogen 3 - 15 W/cm², tijdsduur 20 sec - 60 min.^{8,17}. De verschillende bacteriesoorten zijn niet in gelijke mate gevoelig voor een behandeling met ultrasone geluidsgolven. Horwood e.a.¹⁷ vermelden daarbij dat een verandering van het volume een aanzienlijke invloed heeft op de resultaten. In de praktijk wordt een ultrasone behandeling veelal gebruikt voor het maken van suspensies van celmateriaal. Bij het eigen onderzoek is gebruik gemaakt van een ultrasoon apparaat van de vakgroep Bioprocesstechnologie van de TH. Dit apparaat heeft een werkfrequentie van 20 kHz met een maximum vermogen van 120 W. Apparaten met een hogere werkfrequentie zijn zeer kostbaar en niet meer verenigbaar met een laboratoriumtoets zoals hier wordt beoogd.

Voor sterilisatie door middel van ultraviolette straling wordt straling toegepast met golflengtes kleiner dan 300 nm. Hierbij is vooral straling met een golflengte rond 260 nm effectief¹⁸. De steriliserende werking is afhankelijk van de toegepaste dosis (intensiteit x tijdsduur), de transmissie van de vloeistof voor UV-straling en de dikte van de vloeistoflaag. De doses waarbij organismen een overlevingskans hebben van 10% (D10) staan vermeld in tabel 1. Door Oliver en Cosgrove²¹ wordt voor de UV-bestraling een ultrasone voorbehandeling toegepast (20 kHz; 300 W; 5 min; 1 l) waardoor de grootte van de deeltjes afneemt. Hierdoor worden de aan de deeltjes gebonden organismen beter bereikbaar voor de UV-bestraling zodat de effectiviteit van de voorbehandeling toeneemt.

soort	dosis m W sec/cm ²
bacteriën	1,7 - 8
sporevormers	3,8 - 12
schimmels	30 - 300
protozoën	60 - 100
blauwalgen	300 - 600

Tabel 1. Toegepaste doses UV-straling bij 254 nm, nodig voor 90% reductie van microorganismen³¹

Een aantal mogelijke voorbehandelingsmethoden, genoemd in het rapport van de ad-hoc werkgroep Eutrofiëringstoets², is buiten beschouwing gelaten:

- pasteuriseren - deze methode is immers analoog aan autoclaveren;
- invriezen - dit blijkt geen effectieve methode te zijn (vroeger onderzoek TH-Delft), hoewel deze wel wordt gebruikt¹⁰;
- cel-disruptie - deze methode is niet praktisch toepasbaar: er moet bij hoge druk worden gewerkt en bij grote volumina (1-2 l) is een lange insteltijd noodzakelijk;
- donker incubatie - bij uitsluiting van licht sterven plantaardige organismen af en wordt het organische materiaal afgebroken door bacteriën. Deze methode is tijdrovend en soms niet voldoende effectief. Bovendien moet er daarna nog een behandeling plaatsvinden om de aanwezige bacteriën te inactiveren;
- gamma-straling - waarschijnlijk is deze methode wel effectief, maar niet algemeen toepasbaar.

3.2 Experimenteel

Monsters:

Effluent: monsters zijn genomen uit het effluent van de rioolwaterzuiveringsinrichting van de TH Delft na voorbezinking en actief-slibbehandeling.

Schiewater: monsters via een pijpleiding uit de Schie.

Sterilisatie glaswerk: 3 uur bij 180°C.

Autoclaveren: 20 min. bij 121°C en 1,1 kg/cm²

Filtratie: membraanfilter met poriegrootte 0,45 µm.

Ultrasoon geluid behandeling:

500 ml in bekersglas 1000 ml

frequentie 20 kHz; vermogen 80 W.

behandeltijd: 5, 10, 20 en 30 minuten

Ultraviolet bestralen:

- roestvrijstalen bak 90 x 30 x 15 cm

- 3 ultraviolet lampen: Philips TUV 30 W (10 mW/cm² bij 254 nm) gemonteerd in het deksel op 15 cm boven de bodem

- behandeltijd: 15, 30, 60 en 120 minuten (enkele keren 16 uur)

- monstervolume (diepte): 1 l (4 mm), 2 l (8 mm), 5 l (20 mm)

Aanvankelijk zijn de monsters tijdens de behandeling rondgepompt met behulp van een slangenpomp. Later is gemengd met twee magneetroeders

die onder de roestvrijstalen bak waren geplaatst.

Controle op de steriliteit van de monsters:

- bacteriën: koloniegetal per ml volgens NEN 6560 bij 22°C
- algen: 100 ml monster in 500 ml erlenmeyers op een schudtafel (100 rpm) bij continue belichting (24 W/m²), constante temperatuur (20°C) en luchtvochtigheid (70%). Na 7 dagen controleren op groei door meting van de optische dichtheid bij 759 nm (OD₇₅₉).

3.3 Resultaten en bespreking

Door autoclaveren worden monsters verkregen die geen bacterie- of algengroei meer vertonen (tabel 2). Bij een filtratie van effluent over een membraanfilter van 0,45 µm neemt het aantal bacteriën af. De reductie is echter onvoldoende om de invloed van bacteriën op de toets uit te kunnen sluiten.

	koloniegetal bij 22°C	OD ₇₅₉ na 7 dagen
onbehandeld	$0,8 \times 10^7$	0,217
geautoclaveerd	0	0,030
gefiltreerd	$3,4 \times 10^5$	0,195

Tabel 2. Effect van autoclaveren of filtreren op het koloniegetal en nagroei van algen in effluent

De toegepaste ultrasone behandeling is niet voldoende om bacteriën en algen te inactiveren. Dit blijkt uit de resultaten van de experimenten die zijn samengevat in tabel 3. Hierin valt op dat het koloniegetal en de nagroei van algen na de behandeling aanvankelijk toenemen.

	tijd minuten	koloniegetal bij 22°C	OD ₇₅₉ na 7 dagen
Schiewater	0	$2,7 \times 10^7$	0,141
	5	$2,0 \times 10^7$	0,231
	15	$5,7 \times 10^7$	0,252
	20	$6,8 \times 10^8$	0,276
	30	$2,0 \times 10^8$	0,346
effluent	0	$1,5 \times 10^7$	0,286
	5	$0,8 \times 10^7$	0,317
	10	$8,0 \times 10^7$	0,331
	20	$1,2 \times 10^7$	0,149
	30	$0,8 \times 10^7$	0,153

Tabel 3. Resultaten van de behandeling met ultrasone geluidsgolven (20 kHz; 80 W)

Uit de toename van het koloniegetal kan worden afgeleid dat de deeltjes, waaraan de bacteriën zijn gehecht, door de behandeling uiteenvallen. Bij lange behandelingen (30 min.) loopt de temperatuur van de monsters, door de toevoer van akoestische energie, op tot 60°C. Hierdoor worden thermolabiele bacteriën geïnactiveerd.

	tijd minuten	koloniegetal bij 22°C	OD ₇₅₀ na 7 dagen
Schiewater	0	2,5 x 10 ⁴	0,106
	15	0	0,103
	30	1	0,125
	60	0	0,069
	120	0	0,015
effluent	0	1,0 x 10 ⁵	0,538
	15	2	0,072
	30	1	0,035
	60	3	0,040
	120	0	0,019

Tabel 4. Resultaten van de UV-bestraling
(volume 1 l; vloeistofdiepte 4 mm)

De resultaten van de experimenten waarin de duur van de UV-bestraling is gevarieerd staan in tabel 4. De grootste dosis UV-straling is nodig voor het inactiveren van algen. Bacteriën zijn binnen 15 minuten geïnactiveerd terwijl algen soms na 60 minuten bestraling nog in staat zijn zich te vermeerderen. Als veiligheidsmarge is het noodzakelijk monsters 2 uur te bestralen. Bij toepassing van UV-bestraling op grotere monsters (vloeistofdiepte 8 en 20 mm) neemt de effectiviteit van de behandeling af (tabel 5). Dit komt vooral tot uiting in de groei van algen in het monster waarbij de vloeistofdikte 20 mm bedroeg (OD₇₅₀ na 7 dagen). In de gebruikte opstelling is het niet goed mogelijk om monsters groter dan 2 l binnen 2 uur te steriliseren. Tijdens de bestraling stelt de temperatuur zich na enige tijd (0,5 uur) in op 35 - 37°C. Deze temperatuur blijft ook tijdens lange bestralingen (16 uur) gehandhaafd. Door een dergelijke lange bestraling worden aanvankelijk troebele of gekleurde monsters helder.

	dikte vloeistoflaag (mm)	koloniegetal bij 22°C	OD ₇₅₀ na 7 dagen
Schiewater	onbehandeld	2 x 10 ³	0,175
	8	0	0,051
	20	0	0,062
effluent	onbehandeld	2 x 10 ⁴	0,106
	8	0	0,085
	20	3	0,345

Tabel 5. Resultaten van de UV-bestraling (duur: 1 uur)

Bij het werken met de UV-sterilisatiebak zijn op de volgende punten problemen opgetreden:

- bij het rondpompen van de monsters met een slangenpomp kunnen bacteriën in de slangen met eenzelfde snelheid groeien als waarmee ze in de UV-sterilisatiebak worden gedood. Om dit te voorkomen zijn de monsters tijdens de bestraling gemengd met twee magneetroeders

- die onder de roestvrijstalen bak zijn geplaatst;
- in een ruimte waarin veel bacteriën in de lucht zweven treden bij het aftappen van monsters infecties op. Dit wordt voorkomen door te werken in een ruimte waar het gevaar voor besmetting met bacteriën verwaarloosbaar is. Om bacteriegroei in de aftapslang te voorkomen dient deze kort te zijn. Het glazen uiteinde hiervan is onder 96% ethanol geplaatst en wordt voor het aftappen met een gasvlam gesteriliseerd.

Omdat door een behandeling met UV-straling watermonsters gesteriliseerd kunnen worden is de combinatie van ultrasoon geluid en UV-bestraling niet uitgebreid onderzocht. Er zijn wel enkele experimenten uitgevoerd waarbij een monster eerst is behandeld met ultrasoon geluid (20 kHz; 80 W; 0,5 l; 10 min) en vervolgens met ultraviolette straling (2 uur; 2 l). Deze behandeling leverde steriele monsters op. Van de onderzochte voorbehandelingsmethoden voldoen autoclaveren en UV-bestralen aan de eis dat de overlevingskans van algen en bacteriën gering moet zijn. Filtreren over een 0,45 µm membraanfilter en behandelen met ultrasoon geluid voldoen niet aan deze eis.

4 INVLOED VAN DE VOORBEHANDELING OP DE FYSISCH-CHEMISCHE SAMENSTELLING VAN HET TE ONDERZOEKEN WATER

4.1 Inleiding

De veranderingen die tijdens de geselecteerde voorbehandelingen optreden in de fysisch-chemische samenstelling, zijn onderzocht aan de hand van synthetische monsters. Voor de behandeling zijn die omstandigheden gebruikt waaronder steriele monsters worden verkregen (hoofdstuk 3). Er is uitgegaan van monsters met alleen anorganische verbindingen waarvan de samenstelling representatief is voor oppervlaktewater en effluent. De monsters zijn als volgt behandeld:

O : onbehandeld
F : filtreren over een 0,45 µm membraanfilter
A : autoclaveren (20 min. bij 121°C en 1,1 kg/cm²)
AF : autoclaveren en filtreren
UV : UV-bestralen (2 uur; 10 mW/cm² bij 254 nm; 2 l)
UVF : UV-bestralen en filtreren

In deze monsters zijn de volgende parameters bepaald:

- pH
- TIC : totaal anorganisch koolstof
- N : NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ en totaal -N
- P : PO₄³⁻, totaal-P
- Fe

De filtraties over een membraanfilter van 0,45 µm zijn uitgevoerd om te onderzoeken in welke mate de nutriënten aan deeltjes worden gebonden. Na het onderzoek met alleen anorganische verbindingen is de samenstelling van de monsters uitgebreid met organische stikstof- en fosforverbindingen. Hiermee is de invloed van de voorbehandeling op het vrijkomen van stikstof en fosfor uit organische verbindingen onderzocht. Als modelverbindingen is gekozen voor Adenine (N), Ureum (N), en Adenosine-(5)-mono-fosfaat (P). In de eerste plaats omdat het natuurlijke verbindingen zijn en in de tweede plaats omdat bekend is dat stikstof en fosfor relatief gemakkelijk vrijkomen uit deze verbindingen. Mochten stikstof en fosfor uit deze verbindingen door de voorbehandeling niet gemakkelijk vrijkomen, dan is werken met verbindingen, waarvan bekend is dat stikstof of fosfor in mindere mate vrijkomen niet nodig.

Nutriënten die zijn gebonden in algen en bacteriën kunnen als gevolg van de voorbehandeling vrijkomen. Om te onderzoeken in welke mate dit gebeurt zijn algen en bacteriën opgekweekt in media met een bekende samenstelling. Bij het onderzoek is gekeken naar de veranderingen die optreden in de samenstelling van de monsters met de algen of bacteriën als gevolg van de voorbehandeling en de invloed daarop van de samenstelling van het medium en van de ouderdom van de cultuur.

De vorm en concentratie waarin sporenelementen in de oplossing voorkomen kan worden beïnvloed door de wijze van voorbehandeling. Hierdoor verandert de beschikbaarheid van de sporenelementen voor de algen. De veranderingen kunnen optreden door vorming of afbraak van complexerende verbindingen, adsorptie aan deeltjes door een veranderen van de pH of door coprecipitatie met een tijdens de voorbehandeling ontstaan neerslag. Als modelstoffen voor complexerende verbin-

dingen is gekozen voor citroenzuur en EDTA. De adsorptie aan deeltjes is onderzocht in een oplossing met een zodanig hoge ijzerconcentratie dat een hydroxyapatietneerslag kan ontstaan. In een oplossing met calcium en fosfaat is het effect bekeken van coprecipitatie met calciumfosfaat, een neerslag dat o.a. ontstaat bij verhitting (autoclaveren) van oplossingen met hoge calcium- en fosforgehaltes. Het onderzoek is uitgevoerd met koper vanwege de eigenschap sterke complexen te vormen, mangaan vanwege de sterke adsorptie aan hydroxyapatiet en zink vanwege de redelijk stabiele complexvorming en adsorptie aan hydroxyapatiet. Tijdens het autoclaveren van monsters met een hoge pH of hoge calcium- of fosforconcentraties bestaat de mogelijkheid dat er een neerslag ontstaat. Door een geringe oplosbaarheid van dit neerslag kan fosfor verloren gaan. De vorming van een neerslag kan worden voorkomen door voor autoclaveren de pH te verlagen of de monsters te verdunnen. Of een dergelijke ingreep ook invloed heeft op het resultaat van de algengroei-potentietoets en zoja, in welke mate, is onderzocht bij een aantal praktijkmonsters.

4.2 Monsters met anorganische verbindingen

4.2.1 experimenteel

Tabel 6 toont de samenstelling van de synthetische monsters met alleen anorganische verbindingen. Monster 1 is afgeleid van het kweekmedium Z8² (25% van de voorgeschreven concentraties). De concentraties in het monster representatief voor oppervlaktewater (2) en in monsters representatief voor effluent (3-6) liggen weliswaar aan de hoge kant maar zijn niet extreem hoog. Deze keuze is gemaakt omdat juist bij hogere concentraties effecten te verwachten zijn die bij lage concentraties niet zullen optreden.

nr element	kweek- medium (25%)	opper- vlakte- water	effluent				
			Ca		P		6
			laag	hoog	laag	hoog	
			3	3a	4	5	
N*	21 NO ₃	14 NO ₃	21 NO ₃	21 NH ₄	21 NO ₃	21 NN	21 NN
P	1,4	0,6	3,1	3,1	16	3,1	16
Ca	2,5	60	20	20	20	401	401
Mg	0,6	7,3	2,4	2,4	2,4	49	49
Na	42	60	186	161	186	94	94
K	1,7	16	39	39	39	20	20
C(anorg.)	0,6	30	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
S	0,8	16	42	42	42	128	127
Cl	0,2	71	283	273	251	722	708
Fe	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabel 6. Samenstelling van de synthetische monsters met alleen anorganische verbindingen (mg/l)

(N*: monster 1-3: NO₃-N; monster 3a: NH₄⁺-N; monster 4-6: NH₄NO₃-N(NN)).

De in de behandelde monsters gevonden gehalten (tabel 7 en 8) zijn vergeleken met die in de onbehandelde monsters. Dit om te voorkomen dat verschillen, die te wijten zijn aan fouten in de samenstelling of aan systematische fouten in de analysemethoden, worden toegeschreven aan de voorbehandeling. Alleen veranderingen groter dan 10% worden van betekenis geacht.

		pH	TIC	N			P		Fe	
				NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tot-N	PO ₄ ³⁻	tot-P		
monster 1	O	7,4	2,7	-	21	22	1,4	1,5	0,1	
	F	7,4	2,7	-	22	22	1,3	1,3	-	
	A	7,6	2,7	-	22	22	1,5	1,5	0,1	
	AF	7,5	2,6	-	22	22	1,4	1,4	-	
monster 2	O	8,5	28	-	20	20	0,6	0,6	0,1	
	F	8,5	28	-	20	20	0,6	0,6	-	
	A	8,8	21	-	21	20	0,6	0,6	0,1	
	AF	8,8	22	-	21	20	0,2	0,2	-	
monster 3	O	7,0	1,3	-	19	20	3,2	3,0	0,1	
	Ca laag	F	7,0	1,0	-	19	20	3,1	2,8	-
	P laag	A	7,2	1,0	-	20	20	3,2	2,9	0,1
	NO ₃ ⁻ -N	AF	7,1	1,1	-	20	21	3,1	2,9	-
monster 3a	O	7,0	1,0	23	-	22	3,0	3,0	0,1	
	Ca laag	F	7,0	0,7	23	-	21	3,0	3,0	0,1
	P laag	A	6,9	0,6	23	-	21	3,1	3,0	0,1
	NH ₄ ⁺ -N	AF	6,8	0,4	22	-	21	3,1	3,0	<0,05
monster 4	O	7,0	-	9,5	9,6	20	14	14	0,1	
	Ca laag	F	7,0	-	9,4	9,3	20	14	14	<0,05
	P hoog	A	6,9	-	9,3	10	20	13	14	0,1
	NH ₄ NO ₃ -N	AF	6,9	-	9,6	10	20	13	14	-
monster 5	O	6,9	0,9	7,8	12	22	3,0	3,0	-	
	Ca hoog	F	7,0	1,0	7,8	13	22	3,0	3,0	<0,05
	P laag	A	6,3	0,3	7,8	11	21	3,1	2,8	0,1
	NH ₄ NO ₃ -N	AF	6,4	0,3	7,1	12	21	3,0	2,9	<0,05
monster 6	O	7,0	0,9	8,9	11	21	13	14	-	
	Ca hoog	F	7,0	0,7	8,5	11	21	13	14	<0,05
	P hoog	A	5,5	0,3	8,7	12	21	14	14	<0,05
	NH ₄ NO ₃ -N	AF	5,4	0,3	8,9	12	21	9,9	10	<0,05

Tabel 7. Resultaten van de voorbehandeling (mg/l)

O: onbehandeld

F : na filtratie over 0,45 µm

A: na autoclaveren

AF: na autoclaveren en filtreren

		pH	TIC	N			P		Fe
				NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tot-N	PO ₄ ³⁻	tot-P	
monster 3	O	6,9	1,3	-	20	21	2,9	2,9	0,1
	UV	7,7	3,0	-	20	21	3,2	3,2	0,1
	UVF	7,3	4,8	-	20	22	3,2	3,2	-
monster 3a	O	6,9	1,0	20	-	21	2,9	2,9	<0,05
	UV	7,5	2,6	20	-	21	2,9	3,0	<0,05
	UVF	7,3	2,6	20	-	22	2,9	3,0	-
monster 6	O	7,1	1,0	9,2	10	22	15	15	0,1
	UV	7,	1,2	9,9	10	21	15	15	0,1
	UVF	7,3	1,2	9,7	10	21	15	15	0,1

Tabel 8. Resultaten van de voorbehandeling (mg/l)

O : onbehandeld

UV: na UV-bestralen

UVF: na UV-bestralen en filtreren

4.2.2 resultaten en discussie

Door filtratie kan een deel van de nutriënten, met name fosfor, worden verwijderd. Dit is het geval als geautoclaveerde monsters met een hoge begin pH (monster 2) of hoge calcium- en fosforgehalten (monster 6) worden gefiltreerd. Tijdens het autoclaveren ontstaat een neerslag van fosfor met deeltjes >0,45 µm. Bij de bepaling van orthofosfaat in zuur milieu komt het bij autoclaveren neergeslagen fosfaat weer in oplossing.

IJzer is grotendeels aanwezig in de vorm van deeltjes (>0,45 µm). Dit blijkt uit het feit dat de ijzerconcentratie sterk afneemt na filtratie. Het is niet uitgesloten dat ijzer tijdens de filtratie wordt geadsorbeerd aan de filters waardoor een te klein deel van het ijzer in de fractie <0,45 µm wordt gevonden. Hierin komt geen verandering door autoclaveren of UV-bestralen.

Bij monsters met een hoog gehalte aan anorganisch koolstof loopt de pH tijdens het autoclaveren op doordat bij een hoge temperatuur CO₂ wordt uitgedreven wat een verschuiving van de carbonaatevenwichten tot gevolg heeft. De verwijdering van CO₂ komt tot uiting in de daling van het TIC in alle monsters na autoclaveren. De verschuiving van de pH in de monsters 5 en 6 is niet te verklaren uit de afname van het TIC in het monster na autoclaveren. De buffercapaciteit van deze monsters is echter gering waardoor een kleine verandering in de samenstelling een grote pH-verschuiving kan veroorzaken.

De TIC-gehalten vertonen na de UV-bestraling een kleine toename. De gehalten liggen echter vlak boven de detectiegrens van de meetmethode (0,5 mg/l) zodat hieraan niet veel waarde mag worden toegekend. De toename van de pH wordt, in tegenstelling tot de stijging bij autoclaveren, niet veroorzaakt door een groot verlies van CO₂. Waardoor de toename van de pH dan wel wordt veroorzaakt is niet bekend. Door de filtratie na de bestraling wordt de pH-verschuiving gedeeltelijk teniet gedaan. Dit wijst erop dat de CO₂-concentratie niet in evenwicht is met de atmosfeer. Tijdens de filtratie wordt dit gecorrigeerd door uitwisseling van CO₂ met de atmosfeer.

Na de UV-bestraling worden er geen grote verschillen gevonden in de concentraties van de verschillende stikstofverbindingen en de concentraties van ortho- en totaal-fosfaat. Hieruit kan worden afgeleid dat de UV-bestraling geen invloed heeft op de vorm waarin deze verbindingen voorkomen.

Uit bovenstaande gegevens blijkt dat de voorbehandelingen geen invloed hebben op de anorganische stikstofverbindingen.

Tijdens het autoclavieren van monsters met een hoge pH of hoge calcium- of fosforgehalten slaat echter wel fosfor neer. Daarnaast stijgt de pH van monsters met een hoog anorganisch koolstofgehalte. Bij UV-bestralen treden deze verschijnselen niet op.

4.3 Monsters met organische verbindingen

4.3.1 *experimenteel*

De samenstelling van de monsters met organische N- en P-verbindingen staat beschreven in tabel 9. Voor zover dit mogelijk was, is de samenstelling van de verschillende monsters gelijk aan die weergegeven in tabel 6. Ook de nummering is zoveel mogelijk dezelfde. De monsters zijn op dezelfde wijze behandeld als die met alleen anorganische verbindingen. Omdat bij de UV-bestraling van monsters met anorganische verbindingen weinig veranderingen optreden is maar een deel van de monsters behandeld met UV-straling.

nr elementen	opper- vlake- water	effluent					
		Ca					
		laag				hoog	
		P				hoog	
		laag	laag	laag	laag	hoog	hoog
	2	3	3a	3b	3 ¹	4	6
anorg. N	4,2 NN	7 NO ₃	7 NH ₄	7 NN	21 NN	21 NN	21 NN
org. N	2,8 M	7 A	7 A	7 A	7 M	17,5 M	17,5 M
	4,2 U	7 U	7 U				
	2,8 A						
anorg. P	0	3,1	3,1	3,1	0	7,8	7,8
org. P	0,6 M	0	0	0	3,1 M	7,8 M	7,8 M
Ca	60	20	20	20	20	20	401
Mg	7,3	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	49
Na	60	163	163	163	163	163	71
K	16	24	24	3,9	20	26	9,8
C org.	6,6	9	9	9	12	30	30
C anorg.	30	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
S	16	3,2	11	3,2	11	9,6	128
Cl	106	283	301	283	283	283	672
Fe	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabel 9. Samenstelling van de synthetische monsters met organische stikstof- en fosfaatverbindingen (mg/l)

A: Adenine

U : Ureum

M: Adenosine-5-monofosfaat

NN: NH₄NO₃

monster	pH	TIC	N			P		
			NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tot-N	PO ₄ ³⁻	tot-P	
2	O	8,5	24	3,4	2,2	13	<0,05	0,5
	F	8,5	22	3,4	2,1	13	<0,05	0,5
	A	8,8	15	3,5	2,2	13	<0,05	0,5
	AF	8,8	16	3,5	2,2	12	<0,05	0,5
3	O	7,0	2,5	6,2	7,6	21	3,0	2,9
	F	7,0	3,2	4,3	7,4	20	3,0	2,9
	A	8,3	2,4	3,7	7,4	21	3,0	3,0
	AF	8,2	3,3	5,4	7,5	20	3,1	3,0
3a	O	7,0	2,6	14	-	22	3,2	3,2
	F	6,9	2,7	11	-	21	3,2	3,2
	A	8,1	3,1	11	-	21	3,2	3,2
	AF	8,0	3,2	12	-	21	3,2	3,2
3 ¹	O	7,0	1,0	15	12	27	1,1	3,0
	F	6,9	1,0	15	12	26	1,0	3,0
	A	6,7	0,6	15	11	25	1,0	3,1
	AF	6,7	1,2	15	11	25	1,0	3,1
4	O	7,0	2,0	13	11	39	8,2	15
	F	6,9	2,0	13	11	39	8,4	15
	A	7,0	1,6	12	11	39	9,1	15
	AF	7,0	1,6	12	11	39	9,2	15
6	O	7,0	1,2	14	11	37	8,3	15
	F	7,0	1,0	14	11	37	8,3	15
	A	6,7	0,6	14	11	39	9,4	15
	AF	6,6	0,4	14	11	39	9,0	13

Tabel 10. Resultaten van de voorbehandeling (mg/l)

O: onbehandeld F: na filtratie over 0,45 µm
A: na autoclaveren AF: na autoclaveren en filtreren

De resultaten van de chemische bepalingen staan vermeld in de tabellen 10 en 11.

4.3.2 resultaten na bezinking

Filtratie van de monsters met organische verbindingen heeft, net als bij de monsters bestaande uit alleen anorganische verbindingen, weinig invloed op de fysisch-chemische samenstelling.

De pH-stijging na autoclaveren in de monsters 3 en 3a is groter dan in de overeenkomstige monsters met alleen anorganische verbindingen. In de monsters 3¹, 4 en 6 daalt de pH minder sterk dan in de overeenkomstige anorganische monsters. Dit verschil moet worden toegeschreven aan de aanwezigheid van de organische verbindingen. In monster 2 is door de grotere hoeveelheid anorganisch koolstof de invloed van de organische verbindingen minder sterk waardoor de pH-stijging gelijk is aan het overeenkomstige anorganische monster.

In de concentraties van de stikstof- en fosforverbindingen treden geen grote veranderingen op. Daaruit volgt dat tijdens het autoclaveren slechts een klein deel (<5%) van het organisch gebonden stik-

stof en fosfor wordt vrijgemaakt. Alleen in monsters met een hoge adenosine-(5)-monofosfaat concentratie (monsters 4 en 6) wordt door autoclaveren een deel van het organisch gebonden fosfor vrijgemaakt (10%).

In tegenstelling tot de pH-stijging na UV-bestraling van de anorganische monsters, treedt er in de monsters met organische N- en P-verbindingen een daling op. Deze daling is in overeenstemming met de verwachting dat de pH afneemt door afbraak van de organische verbindingen onder invloed van de ultraviolette straling. De afbraak van de organische verbindingen heeft echter niet tot gevolg dat de binding van stikstof en fosfor met de organische moleculen wordt verbroken, omdat er geen grote veranderingen optreden in de concentraties anorganische stikstof- en fosforverbindingen voor en na de bestraling.

Evenals bij de anorganische monsters wordt de pH-verandering gedeeltelijk teniet gedaan door een op de UV-bestraling volgende filtratie. De conclusie die uit dit experiment kan worden getrokken is dat organische stikstof- en fosforverbindingen niet of slechts in geringe mate door de voorbehandelingsmethoden worden verbroken. In monsters met een laag anorganisch koolstofgehalte treedt tijdens autoclaveren een pH-stijging op die moet worden toegeschreven aan de organische verbindingen. De pH daalt tijdens de UV-bestraling door afbraak van organische verbindingen.

monster	pH	TIC	N			P	
			NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tot-N	PO ₄ ³⁻	tot-P
2 O	8,4	16	1,7	1,8	14	<0,05	0,5
UV	7,7	16	1,6	1,7	14	<0,05	0,5
UVF	8,5	17	1,5	1,7	14	0,1	0,5
3b O	7,0	1,1	-	3,4	20	3,0	3,1
UV	6,3	1,3	-	3,2	21	2,9	3,0
UVF	6,9	1,4	0,1	3,2	21	2,9	3,0
3 ¹ O	7,0	1,5	2,2	9,9	26	0,2	2,3
UV	5,5	1,7	2,0	9,4	27	0,2	2,3
UVF	5,6	1,7	1,6	9,2	28	0,3	2,3
6 O	6,9	1,5	2,4	8,8	24	7,8	13
UV	6,3	1,3	2,7	8,8	26	7,7	13
UVF	6,6	1,1	3,4	8,6	27	7,1	13

Tabel 11. Resultaten van de voorbehandeling (mg/l)

O : onbehandeld monster

UV: na UV-bestrallen UVF: na UV-bestrallen en filtreren

4.4 Vrijkomen van nutriënten uit algen en bacteriën

4.4.1 *experimenteel*

Als toetsalg voor het onderzoek naar het vrijkomen van nutriënten uit algen is gekozen voor de groenalg *Scenedesmus quadricauda*. Voor het kweken van bacteriën is als ent 1 ml effluent per liter medium toegevoegd.

De algen of bacteriën zijn gekweekt onder de gebruikelijke omstandigheden (5.2.1) in media met een bekende samenstelling (tabel 12). In de media zijn de algen en bacteriën als volgt opgekweekt:

nr elementen	oppervlaktewater			
		Ca hoog	P hoog	Ca hoog P hoog
	1	2	3	4
N	18	14	5	16
P	0,4	0,5	1,7	1,6
Ca	30	120	30	400
Mg	7,3	7,3	7,3	49
Na	6	6	6	186
K	15	15	16	204
C	3	3	3	1,2
S	16	16	16	240
Cl	18	178	34	814
Fe	0,3	0,6	0,3	0,6
glucose				1000

Tabel 12. Samenstelling van de kweekmedia voor algen en bacteriën (mg/l)

Medium 1: nutriëntengehalten op oppervlaktewaterniveau

monster a: algen in de exponentiële fase

monster b: algen in de stationaire fase

Medium 2: hoog calciumgehalte, verder gelijk aan medium 1

monster c: algen in de exponentiële fase

Medium 3: hoog fosforgehalte, laag stikstofgehalte, verder gelijk aan medium 1.

monster d: algen in de stationaire fase

Medium 4: hoge calcium- en fosforgehalten, glucose als voedingsbron voor de bacteriën.

monster e: bacteriën in de exponentiële fase

monster f: bacteriën in de stationaire fase

De resultaten van de bepalingen na de voorbehandeling staan in tabel 13.

4.4.2 resultaten en interpretatie

In de monsters met algen worden als gevolg van de voorbehandelingsmethode geen grote veranderingen gevonden in de concentraties van de stikstofverbindingen (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-). Hieruit kan worden afgeleid dat er tijdens de voorbehandeling geen anorganisch stikstof vrijkomt. In de monsters met bacteriën is na autoclaveren en na UV-bestralen een toename gevonden van $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in de filtreerbare (<0,45 μm), en in de niet filtreerbare fractie (>0,45 μm). Een deel van het in bacteriën gebonden stikstof komt dus wel vrij maar niet in de opgeloste fractie.

het in de monsters aanwezige fosfor is grotendeels door de algen

medium	algen/bact.	pH	N			P		Fe	
			NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tot-N	PO ₄ ³⁻	tot-P		
1a	algen	O	7,7	0,3	14	16	0,2	0,3	0,3
		exp.fase	F	7,7	0,1	14	16	<0,05	0,1
	exp.fase	A	6,9	0,1	13	18	0,2	0,3	0,3
		AF	7,1	0,1	13	16	0,2	0,3	0,1
		UV	5,1	<0,05	12	17	0,1	0,3	0,2
		UVF	7,1	-	12	16	0,1	0,2	0,1
1b	algen	O	7,6	0,3	17	22	-	0,3	0,3
		stat.fase	F	7,0	0,1	17	21	<0,05	<0,05
	stat.fase	A	6,8	0,3	18	24	0,3	0,4	0,2
		AF	7,5	0,1	17	23	0,2	0,2	0,1
		UV	6,3	-	16	12	0,1	0,3	0,2
		UVF	7,2	-	16	12	0,1	0,2	0,2
2c	algen	O	8,0	0,4	11	13	0,1	0,5	0,6
		exp.fase	F	7,9	0,1	11	12	<0,05	0,1
	exp.fase	A	7,7	0,4	11	14	0,3	0,5	0,6
		AF	7,8	0,2	10	13	0,1	0,4	<0,05
		UV	7,7	0,1	10	13	0,1	0,4	0,2
		UVF	7,6	-	9,4	13	0,1	0,3	<0,05
3d	algen	O	8,0	0,2	4,3	5,0	<0,05	1,7	0,3
		stat.fase	F	8,1	0,1	3,1	3,6	<0,05	0,1
	stat.fase	A	7,4	0,1	4,4	4,8	1,1	1,7	0,3
		AF	7,5	<0,05	3,0	4,0	0,3	0,7	<0,05
		UV	7,4	0,1	4,5	4,6	0,3	1,0	0,2
		UVF	7,6	<0,05	3,6	3,7	0,2	0,9	-
4e	bact.	O	3,3	0,4	8,3	16	1,0	1,5	0,6
		exp.fase	F	3,4	0,3	8,2	11	0,2	0,3
	exp.fase	A	3,3	2,0	9,9	16	0,8	1,6	0,6
		AF	3,2	0,3	9,3	14	0,3	1,1	0,4
		UV	3,7	3,7	9,2	16	0,6	1,3	1,2
		UVF	3,6	1,4	9,0	14	0,3	1,1	1,0
4f	bact.	O	3,3	0,3	9,7	15	0,6	1,2	0,3
		stat.fase	F	3,3	0,7	9,9	14	0,3	0,5
	stat.fase	A	3,5	4,9	10	16	0,8	1,6	0,3
		AF	3,4	2,3	10	15	0,4	1,3	0,7
		UV	4,3	6,6	9,3	17	1,3	1,8	1,3
		UVF	3,7	2,1	9,1	16	0,4	1,6	1,2

Tabel 13. Invloed van de voorbehandeling op het vrijkomen van nutriënten (mg/l)

O : onbehandeld F : na filtratie
A : na autoclaveren AF : na sutoclaveren en filtreren
UV: na UV-bestralen UVF: na UV-bestralen en filtreren
exp.: exponentiële fase stat.: stationaire fase

opgenomen. In monsters met algen in de stationaire fase is $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ nagenoeg uitgeput. Door autoclaveren neemt de orthofosfaatconcentratie in de monsters toe tot ongeveer 70% van de totaal-P-concentratie. Na filtratie is de orthofosfaatconcentratie het hoogst in monsters met lage calcium- en fosforgehalten. Daarnaast is een effect merkbaar van de ouderdom van de algencultuur. Na autoclaveren en filtreren komt meer orthofosfaat vrij in de monsters met algen in de exponentiële fase dan in monsters met algen in de stationaire fase.

Autoclaveren heeft echter geen éénduidige invloed op de orthofosfaatconcentratie. Na autoclaveren is het gehalte aan orthofosfaat in het monster met bacteriën in de exponentiële groeifase lager, in het monster met bacteriën in de stationaire fase juist hoger dan voor deze behandeling.

Gezien de afname van de totaal-P-concentratie na de UV-bestraling blijft 20-30% van het fosfor achter door bezinking van algen in de sterilisatiebak. Doordat een deel van het gebonden fosfor wordt vrijgemaakt door de UV-bestraling neemt de fosforconcentratie in de fractie $<0,45 \mu\text{m}$ echter wel toe.

Evenals in de synthetische monsters bevindt ijzer zich voor een deel in de fractie $>0,45 \mu\text{m}$. Hierin komt geen verandering door de voorbehandeling. Tijdens de UV-bestraling van de monsters met algen bezinkt een deel van het ijzer in de sterilisatiebak. De toename van de ijzerconcentratie na de UV-bestraling van de monsters met bacteriën is te wijten aan het in oplossing gaan van ijzer uit de roestvrijstalen bak.

Uit de resultaten van de experimenten kan worden afgeleid dat, bij de toegepaste voorbehandelingen, het in algen gebonden stikstof niet vrijkomt en het in bacteriën gebonden stikstof slechts voor een deel (20-30%). Bij autoclaveren van monsters met algen komt een groot deel van het fosfor vrij. Het in bacteriën gebonden fosfor komt daarentegen niet vrij. Tijdens het UV-bestralen gaat een deel van het in algen gebonden fosfor verloren door bezinking in de sterilisatiebak.

4.5 Sporenelementen

4.5.1 *experimenteel*

Voor het onderzoek naar de invloed van de voorbehandeling op sporenelementen zijn de veranderingen bepaald die optreden in de vorm en concentraties van koper, mangaan en zink. De totaalconcentraties zijn gemeten door middel van atomaire absorptiespectrometrie. De concentraties van de zwak gebonden en vrije ionen zijn met behulp van een electrochemische methode (anodische heroplossingsvoltametrie met differentiële pulspolarografie¹¹) bepaald bij de in een monster heersende pH. De samenstelling van de monsters staat vermeld in tabel 14 en de resultaten van de uitgevoerde bepalingen in tabel 15.

nr elementen	kweekmedium (10%)		oppervlakte- water	effluent Ca hoog P hoog
	1a	1b	2	6
N	8,4	8,4	14	21
P	0,6	0,6	0,6	16
Ca	1	1	60	401
Mg	0,2	0,2	7,3	49
Na	15	15	60	94
K	0,7	0,7	16	20
Cl	-	-	71	708
S	0,3	0,3	16	128
C anorg.	1,2	1,2	30	1,2
Citroenzuur	2,9	-	-	-
EDTA	-	1,1	-	-
Fe	-	-	0,223	-
Mn	0,004	0,004	0,390	0,390
Zn	0,002	0,002	0,136	0,136
Cu	0,002	0,002	0,135	0,135

Tabel 14. Samenstelling van de monsters met sporenelementen (mg/l)

4.5.2 resultaten en bespreking

EDTA en Citroenzuur

De complexerende werking van EDTA en citroenzuur wordt niet beïnvloed door de voorbehandelingen. Dit blijkt uit het feit dat na de voorbehandeling de concentraties van de zwak gebonden en de vrije metaal-ionen niet toenemen (monsters 1a en 1b).

De toename van de concentratie van de zwak gebonden of vrije mangaan-ionen na de UV-bestraling is veroorzaakt doordat mangaan vrijkomt uit de roestvrijstalen bak. Dit blijkt ook uit de toename van de totaal mangaanconcentratie.

IJzerhydroxyde neerslagen

Door autoclaveren worden de metaal-ionen voor een deel geadsorbeerd aan ijzerhydroxyde deeltjes (monster 2). Dit blijkt uit het feit dat de totaalconcentraties bij filtratie na autoclaveren afnemen. Dit effect treedt ook op na UV-bestraling van de monsters. Doordat bij een filtratie de aan de ijzerhydroxyde neerslag gebonden metaal-ionen worden verwijderd zijn de na filtratie resterende metaal-ionen grotendeels aanwezig in de zwak gebonden of vrije ionvorm.

Calciumfosfaat neerslag

Koper en zink worden ingesloten in een calciumfosfaatneerslag dat gevormd wordt tijdens het autoclaveren. Dit blijkt uit het feit dat door filtratie een deel van de metaal-ionen wordt weggenomen en het grootste deel van de na de filtratie resterende koper- en zink-ionen aanwezig zijn als zwak gebonden of vrij ion. Mangaan vertoont dit gedrag in mindere mate.

Uit de resultaten blijkt dat de behandelingsmethoden geen invloed

hebben op het complexerend vermogen van EDTA en citroenzuur. Door de voorbehandelingen treedt door adsorptie aan ijzerhydroxydedeeltjes een daling op in de concentraties van de opgeloste metaalionen. Als tijdens autoclaveren een neerslag ontstaat, gaan er door insluiting sporenelementen verloren.

		Mn		Zn		Cu		Fe
		vrij	totaal	vrij	totaal	vrij	totaal	totaal
1a	O	0,004	0,003	0,003	s	0,005	*	-
	F	0,003	0,001	0,003	s	0,008	*	-
	A	0,003	0,004	0,003	s	0,009	*	-
	AF	0,003	0,003	0,004	s	0,009	*	-
	UV	0,012	0,014	0,005	s	*	*	-
	UVF	0,013	0,014	0,007	s	*	*	-
1b	O	*	0,002	*	s	0,012	*	-
	F	*	0,002	*	s	*	0,01	-
	A	*	0,003	*	s	*	0,01	-
	AF	*	0,003	*	s	0,013	0,01	-
	UV	<0,01	0,039	*	s	*	s	-
	UVF	0,01	0,039	*	s	*	0,02	-
2	O	0,40	0,39	0,03	0,12	0,06	0,11	0,19
	F	0,46	0,39	0,07	0,07	0,08	0,05	0,01
	A	0,06	0,35	0,02	0,13	0,02	0,11	0,20
	AF	0,03	0,30	<0,01	0,01	<0,01	0,01	0,02
	UV	0,07	0,31	0,10	0,07	*	0,07	0,20
	UVF	0,04	0,10	0,01	0,01	*	0,01	*
7	O	s	0,41	s	0,17	s	0,12	-
	F	s	0,40	s	0,17	0,12	0,10	-
	A	0,30	0,43	0,06	0,16	0,06	0,09	-
	AF	0,21	0,34	0,06	0,08	0,06	0,04	-
	UV	0,27	0,45	0,17	0,18	0,05	0,05	-
	UVF	0,21	0,42	0,12	0,18	0,03	0,03	-

Tabel 15. Resultaten van de experimenten met sporenelementen (mg/l)

O : onbehandeld F : na filtreren
 A : na autoclaveren AF : na autoclaveren en filtreren
 UV: na UV-bestralen UVF: na UV-bestralen en filtreren
 * : niet meetbaar s: storing -: niet bepaald

4.6 Effecten van pH-verlaging en verdunning

In het voorafgaande deel van het onderzoek is gebleken dat bij toepassing van autoclaveren als voorbehandelingsmethode de mogelijkheid bestaat dat er bij een hoge pH of hoge calcium- en fosforconcentratie neerslagen ontstaan. Hierdoor kunnen nutriënten verloren gaan. Dit kan worden voorkomen door pH-verlaging of verdunning voor de voorbehandeling. Wat het effect is van deze ingrepen op de resultaten van de algengroei-potentietoets, is nader onderzocht op monsters oppervlaktewater, effluenten en mengmonsters van beiden.

4.6.1 *pH-verlaging*

Oppervlaktewater

Als oppervlaktewater zijn monsters uit de Put van Broeckhoven (bij Bodegraven) en de Akkerdijkse Plassen (bij Pijnacker) genomen. Dit zijn beide plassen die nauwelijks door afvalwaterlozingen beïnvloed worden.

De proeven zijn twee- resp. driemaal uitgevoerd. Voor het autoclavieren zijn de monsters aangezuurd tot een bepaalde pH-waarde.

De chemische samenstelling van de monsters en de resultaten van de algengroei-potentietoets zijn weergegeven in de tabellen 16 en 17. De algengroei-potentiewaarden zijn uitgedrukt in OD₇₅₀, optische dichtheid gemeten bij 750 nm, een maat voor het biovolume (zie H8). Van de aangezuurde monsters is slechts de chemische samenstelling na autoclavieren weergegeven.

pH			N			P		Fe	Ca	datum	OD ₇₅₀
O	K	A	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tN	PO ₄ ³⁻	tP				
7,9			0,4	0,1	0,5	0,1	0,1	<0,05		16-12	
		8,6	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1		1983	0,070
	7,0	8,5	0,5	0,1	0,5	0,1	0,1				0,072
	6,5	8,4	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1				0,077
	6,0	8,1	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1				0,081
	5,5	7,8	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1				0,086
	5,0	7,4	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1				0,090
8,4			<0,05	0,5	0,6	*	<0,05	<0,05	50	10-05	
		8,5	<0,05	0,5	0,6	*	<0,05	<0,05	37	1984	0,075
	6,0	7,6	0,1	0,3	0,5	<0,05	<0,05	<0,05	50		0,033
	5,0	7,6	0,1	0,3	0,5	<0,05	<0,05	<0,05	48		0,168

Tabel 16. Samenstelling van monsters oppervlaktewater uit de Put van Broeckhoven en de waarden voor de AGP (uitgedrukt als OD₇₅₀)

(O: onbehandeld; K: na pH-verlaging; A: na autoclavieren; *: niet meetbaar; N, P, Fe en Ca in mg/l)

Uit deze tabellen blijkt dat tijdens het autoclavieren de pH sterk oploopt door uitdrijving van CO₂ en verschuiving in het carbonaatevenwicht. De biomassa neemt in vier van de vijf series significant toe bij voorafgaande verlaging van de pH van de monsters.

Effluent

Het effluent is onttrokken aan de rwzi van de TH-Delft en de rwzi Nieuwveen. In eerste instantie is voor de pH-reeks onverdund effluent gebruikt. Daar de onderzochte effluënten zeer hoge nutriëntenconcentraties bevatten, zijn de verkregen algengroei-potentiewaarden zeer hoog. Hierdoor kan in de cultuur lichtbeperking optreden. Om dit te voorkomen zijn volgende series effluent verdund met gedestilleerd water. De chemische samenstelling van de monsters en de resultaten van de algengroei-potentietoets zijn weergegeven in de tabellen 18 en 19.

pH			N			P		Fe	Ca	datum	OD ₇₅₀
O	K	A	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tN	PO ₄ ³⁻	tP				
9,2			<0,05	0,6	1,8	0,2	0,4	0,2	85	21-02-	
		9,6	0,1	0,6	1,8	0,1	0,5	0,2	88	1984	0,173
	7,0	8,2	0,1	0,2	1,7	<0,05	0,4	0,2	89		0,151
	6,5	8,0	0,1	0,2	1,9	0,2	0,4	0,3	89		0,152
	6,0	7,4	<0,05	0,2	1,9	0,3	0,4	0,3	90		0,160
	5,5	7,1	0,1	0,2	1,9	0,1	0,4	0,3	87		0,162
	5,0	4,9	0,1	0,2	1,9	0,3	0,4	0,2	88		0,173
8,5			0,1	0,9	1,0	0,3	0,4	0,1	80	10-04-	
		9,3	0,1	1,0	1,1	0,1	0,3	0,2	85	1984	0,052
	6,0	8,3	0,1	1,0	1,1	0,4	0,5	0,1	88		0,041
	5,0	6,4	0,1	1,0	1,1	0,4	0,5	0,1	88		0,051
8,3			1,1	0,3	1,5	1,7	1,8	0,2	105	13-06-	
		7,6	0,9	0,2	1,2	0,1	0,3	0,1	96	1984	0,134
	6,0	7,0	1,0	0,3	1,4	0,8	1,3	0,1	105		0,203
	5,0	7,8	1,2	0,3	1,5	1,8	1,8	0,0	104		0,208

Tabel 17. Samenstelling van monsters oppervlaktewater uit de Akkerdijkse Plassen en de waarden voor de AGP (uitgedrukt in OD₇₅₀)

(O: onbehandeld; K: na pH-verlaging; A: na autoclaveren; N, P, Fe en Ca in mg/l)

pH			N			P		Fe	Ca	datum	OD ₇₅₀
O	K	A	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tN	PO ₄ ³⁻	tP				
8,5			0,3	19	19	3,3	3,2		109	27-01-	
		8,5	0,3	19	19	0,3	2,9		97	1984	1,552
	6,5	8,5	0,3	19	21	0,3	3,1		110		1,516
	6,0	8,1	0,3	20	20	0,5	3,1		109		1,627
	5,5	7,6	0,3	20	20	1,9	3,2		112		1,630
	5,0	6,9	0,4	20	20	3,6	3,6		123		1,539
7,5			0,2	16	16	3,9	4,0	0,1	82	10-04-	verdunding 1:7
		8,8	0,1	16	16	0,3	3,9	0,2	80	1984	0,328
	6,0	7,6	<0,05	2,0	2,1	0,5	0,5	<0,05	4,6		0,339
	5,0	6,3	<0,05	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5	6,3		0,271

Tabel 18. Samenstelling van monsters effluent van rwzi Nieuwveen en de waarden voor de AGP (uitgedrukt in OD₇₅₀).

(O: onbehandeld; K: na pH-verlaging; A: na autoclaveren; N, P, Fe en Ca in mg/l)

pH			N			P		Fe	Ca	datum	OD ₇₅₀
O	K	A	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	tN	PO ₄ ³⁻	tP				
7,0			26	55	76	3,0	3,8	0,1		23-11-	3,8
		8,8	24	54	72	0,2	3,0	0,1		1983	
	6,0	7,7	27	52	74	3,2	3,9	0,1			
	5,5	6,8	27	49	73	3,1	4,0	<0,05			
	5,0	5,9	26	52	75	3,2	3,9	0,1			
6,1			21	47	75	6,7	7,5	1,0	665	10-05-	verdunding 1:15
		6,4	21	47	77	6,6	8,1	1,0	689	1984	0,500
	6,0	6,9	verdunding 1:15			0,6	0,6	<0,05	44		0,670
	5,0	6,4	14	3,1	4,9	0,5	0,7	<0,05	43		0,735
7,4			2,7	62	67	8,8	8,9	<0,05	326	13-06-	0,439
		7,2	2,7	62	69	8,8	8,8	<0,05	417	1984	
	6,0	6,4	verdunding 1:15			0,6	0,6	*	21		
	5,0	6,4	0,1	3,8	4,1	0,6	0,6	*	23		
			0,1	3,9	4,1	0,6	0,6	*			

Tabel 19. Samenstelling van monsters effluent van rwzi TH-Delft en de waarden voor de AGP (uitgedrukt in OD₇₅₀)

(O: onbehandeld; K: na pH-verlaging; A: na autoclaveren;
*: niet meetbaar; N, P, Fe en Ca in mg/l)

De reactie van *Scenedesmus quadricauda* op de veranderingen van de pH van de effluënten uitgedrukt als OD₇₅₀, varieert. In de reeks onverdunde monsters van de rwzi TH-Delft treedt bij verlaging van de pH een verminderde groei op. Door deze pH-verlaging kunnen er veranderingen in het effluent optreden, waardoor groeiremmende stoffen kunnen vrijkomen. Dit effluent bevat namelijk voor een belangrijk gedeelte niet-huishoudelijk afvalwater. Door het effluent eerst te verdunnen (tot 1:15) verdwijnt dit effect.

Deze verklaring kan niet gelden voor het effluent van de rwzi Nieuwveen. Hier treedt bij verdunning juist een verlaging op van de OD₇₅₀. Een verklaring hiervoor is niet gevonden.

Mengmonsters van effluent en oppervlaktewater

Deze mengmonsters bestaan uit 10% effluent en 90% oppervlaktewater. In de tabellen 20 en 21 zijn de chemische samenstelling van deze mengmonsters en de resultaten van de algengroei-potentietoetsen (als OD₇₅₀) weergegeven.

De resultaten van de algengroei-potentietoets geven eenzelfde beeld te zien als de reeks van het effluent. Het groeistimulerend effect is, gezien de verkregen waarden wat sterker dan bij verdunning van het effluent met gedestilleerd water. Het oppervlaktewater kan chelerende stoffen bevatten, die hier een positieve bijdrage leveren.

pH			N			P		Fe	Ca	datum	OD _{5%}
O	K	A	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	EN	PO ₄ ³⁻	tP				
+PvB											
8,2			1,7	3,2	7,3	0,1	0,8	<0,05	120	10-05-1984	0,632
		9,0	1,7	3,4	7,3	0,1	0,7	<0,05	125		
	6,0	7,7	1,6	3,4	7,3	0,4	0,8	<0,05	123		
	5,0	7,1	2,2	3,3	7,4	0,4	0,7	0,1	114		
+AP											
8,3			1,1	3,8	7,1	2,0	2,3	0,1	131	13-06-1984	0,512
		8,3	0,2	1,5	2,1	0,2	0,6	<0,05	33		
	6,0	7,6	1,1	3,7	6,9	2,0	2,3	0,1	140		
	5,0	7,6	0,9	3,6	6,7	0,9	1,0	0,2	132		

Tabel 20. Samenstelling van monsters van effluent van de rwzi TH-Delft (10%) gemengd met oppervlaktewater uit de Put van Broeckhoven (PvB) resp. Akkerdijkse Plassen (AP) (90%) en de waarden voor de AGP (uitgedrukt in OD_{5%}).

(O: onbehandeld; K: na pH-verlaging; A: na autoclaveren; N, P, Fe en Ca in mg/l).

pH			N			P		Fe	Ca	datum	OD _{5%}
O	K	A	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	EN	PO ₄ ³⁻	tP				
+PvB											
8,3			<0,05	2,0	2,0	0,4	0,4	<0,05	43	10-04-1984	0,317
		9,1	<0,05	1,9	2,0	0,2	0,4	<0,05	46		
	6,0	8,3	<0,05	1,9	1,9	0,4	0,4	0,1	49		
	5,0	7,0	<0,05	1,9	1,9	0,4	0,4	0,2	51		
+AP											
8,1			0,1	1,5	1,6	0,5	0,5	0,1	78	10-04-1984	0,291
		9,1	0,1	1,5	1,7	0,2	0,5	0,2	85		
	6,0	8,3	0,1	1,6	1,6	0,5	0,6	0,1	85		
	5,0	7,0	0,1	1,6	1,6	0,6	0,6	0,1	86		

Tabel 21. Samenstelling van monsters van effluent van de rwzi Nieuwveen (10%) gemengd met oppervlaktewater uit de Put van Broeckhoven (PvB) resp. Akkerdijkse Plassen (AP) (90%) en de waarden voor de AGP (uitgedrukt in OD_{5%}).

(O: onbehandeld; K: na pH-verlaging; A: na autoclaveren; N, P, Fe en Ca in mg/l).

4.6.2 Verdunning

De mate van verdunning is afhankelijk van het fosforgehalte. Volgens een logaritmische reeks zijn de monsters met gedestilleerd water verdund tot het fosforgehalte 0,02 mg/P/l bedroeg. Van de gehele

reeks is de algengroei potentie bepaald.

De lijn die door de gevonden waarden van een verdunningsreeks loopt, is berekend. De regressiecoëfficiënt hiervan is de faktor waarmee het maximale biovolume (OD_{750}) afneemt bij een verdunning 1:1.

Oppervlaktewater

Van verschillende oppervlaktewateren zijn verdunningsreeksen ingezet: Put van Broeckhoven, Akkerdijkse Plassen, Kagerplassen, Braassemermeer en de recreatieplas bij Zoetermeer. De resultaten van de algengroei potentietoets, weergegeven als OD_{750} , de regressie- en de correlatiecoëfficiënt zijn weergegeven in tabel 22.

plas	maand	AGP-waarden				regr. coëff.	correl. coëff.
		verdunning					
		onv.	1:1	1:3	1:7		
PvB	dec.	0,070	0,043	0,024		0,77	0,999
AP	febr.	0,182	0,091	0,047	0,039	0,76	0,974
	juni	0,125	0,037	0,027		0,83	0,999
K	nov.	0,309	0,167	0,092	0,053	0,85	0,999
B	nov.	0,227	0,118	0,072	0,043	0,79	0,998
Z	nov.	0,293	0,057	0,040	0,030	1,04	0,911

Tabel 22. AGP-waarden (OD_{750}), regressie- en correlatiecoëfficiënt van verdunningsreeksen van water uit de Put van Broeckhoven (PvB), Akkerdijkse Plassen (AP), Kagerplassen (K), Braassemermeer (B) en de recreatieplas bij Zoetermeer (Z)

De regressiecoëfficiënt is niet voor alle wateren gelijk. Enkele waarden liggen rond 0,77 (0,76 - 0,79), andere rond 0,84 (0,83 - 0,84) en één waarde is 1,04. Op grond van deze resultaten is er geen gemiddelde coëfficiënt te vinden, waardoor extrapolatie van het maximale algengroei potentiewaarde van monsters verdund oppervlaktewater naar die van onverdund oppervlaktewater mogelijk is.

Effluent

Met effluent van de rwzi TH-Delft en Nieuwveen zijn verdunningsreeksen gemaakt. De resultaten zijn weergegeven in tabel 23. Ook hier zijn de resultaten van de algengroei potentietoets weergegeven als OD_{750} .

Bij het berekenen van de regressiecoëfficiënt zijn bij het effluent van rwzi-Delft de onverdunde monsters niet in de berekening betrokken. Waarschijnlijk zijn in deze dichte cultuur groei remmende factoren opgetreden.

De gevonden regressiewaarden komen met elkaar overeen, gemiddeld 0,85. Hoewel vier reeksen nog een gering aantal is, lijkt de mogelijkheid aanwezig om vanuit algengroei potentiewaarden, verkregen uit verdunde monsters de potentiële algengroei potentie van het onverdunde monster te extrapoleren.

rwzi	maand	AGP-waarden						regr. coëff.	correl. coëff.
		verduunning							
		onv.	1:1	1:3	1:7	1:15	1:31		
TH-D	nov.	(3,757)	3,524	2,925	1,174	0,577	0,345	0,85	0,999
	mei	(2,526)	2,401	1,338	-	0,498	0,282	0,100	0,990
	juni	(3,757)	3,703	1,878	-	0,578	0,315		0,999
Nieuw-veen	jan.	1,540	0,984	0,708	0,343	0,155	0,100	0,82	0,991

Tabel 23. AGP-waarden (OD_{700}), regressie- en correlatiecoëfficiënt van verdunningsreeksen van effluent van rwzi TH-Delft en Nieuw-veen.

Mengmonsters van effluent en oppervlaktewater

De resultaten van mengmonsters van effluent (10%) en oppervlaktewater (90%) zijn weergegeven in tabel 24.

Ook uit deze resultaten blijken de regressiecoëfficiënten met elkaar overeen te komen. De gemiddelde waarde is 0,93.

rwzi	opper- vlakte- water	maand	AGP-waarden					regr. coëff.	correl. coëff.
			verduunning						
			onv.	1:1	1:3	1:7	1:15		
TH-D	PvB	mei	0,800	0,388	0,193	0,101	0,054	0,97	0,999
	AP	juni	0,651	0,403	0,184			0,91	0,989
Nieuw-veen	PvB	april	0,317	0,135	0,090			0,91	0,979
	AP		0,289	0,141	0,080			0,93	0,998

Tabel 24. AGP-waarden (OD_{700}), regressie- en correlatiecoëfficiënt van verdunningsreeksen van mengmonsters van effluent (10%) en oppervlaktewater (90%)

(PvB: Put van Broeckhoven; AP: Akkerdijkse Plassen)

4.7 Eindconclusies voorbehandeling

- Van de onderzochte voorbehandelingsmethoden voldoen autoclaveren en UV-bestrallen aan de eisen van een geringe overlevingskans voor algen en bacteriën en van algemene toepasbaarheid. Beide methoden voldoen echter niet aan de eis dat er geen verlies van nutriënten mag optreden. Tijdens autoclaveren ontstaat bij hoge pH of bij hoge calcium- of fosfaatconcentraties een slecht oplosbaar neerslag, waarbij ook sporenelementen worden ingesloten. Tijdens UV-bestrallen gaan nutriënten verloren door bezinking van deeltjes in de UV-bak.
- Als voorbehandelingsmethode is gekozen voor autoclaveren omdat hiermee snel grote volumina gesteriliseerd kunnen worden en omdat de apparatuur in de meeste laboratoria aanwezig is. De tijdsduur die nodig is voor sterilisatie door UV-bestraling is veel langer.
- Een nadeel van autoclaveren is dat in monsters waarin een groot deel van de nutriënten gebonden is in algen, rekening gehouden

moet worden met het feit dat fosfaat wel en stikstof niet wordt vrijgemaakt. Hierdoor kunnen verkeerde conclusies worden getrokken.

- Filtratie van de monsters moet sterk worden ontraden omdat daarbij alle aan deeltjes gebonden nutriënten verloren gaan. Dit geldt niet alleen voor de macronutriënten maar ook voor sporenelementen die aan ijzerhydroxyde deeltjes geadsorbeerd zijn of in neerslagen zijn ingesloten.
- pH-verlaging van de monsters vóór het autoclaveren kan zowel groei-stimulatie als groeiremming tot gevolg hebben. Daar het geen één- duidige reactie is, is extrapolatie vanuit een monster waarvan de pH verlaagd is, naar het monster met de oorspronkelijke pH niet mogelijk. Deze methode is daarom niet geschikt om de negatieve ef- fecten van autoclaveren op het calcium- en fosforgehalte op te heffen.
- Verdunning van de monsters vóór het autoclaveren is een goede me- thode. Na enige malen verdunnen (1:3) vormen zich geen neerslagen meer. Uit de verdunningsreeksen, uitgevoerd met effluent en meng- monsters, zijn de regressiecoëfficiënten 0,85 resp. 0,93 berekend. Een meer uitgebreid onderzoek zal moeten uitwijzen of de gevonden waarden algemeen geldend zijn. Mocht dit niet het geval zijn, dan kan men altijd op grond van de resultaten van enkele verdunningen de potentiële waarde voor de algengroei-potentie van het onverdunde monster berekenen.
- Bij het berekenen van de regressiecoëfficiënt voor monsters opper- vlaktewater zijn verschillende waarden gevonden. Hieruit moet ge- concludeerd worden dat verdunning bij dit soort monsters niet goed bruikbaar is. In het algemeen zal bij het autoclaveren van oppervlaktewater, ge- zien de gehalten aan fosfor en calcium, geen extra voorbehandeling nodig zijn.

5 KEUZE TOETSALG

5.1 Inleiding

In de literatuur bestaat weinig eenduidigheid over de keuze van het toetsorganisme^{1, 2, 3}. De mogelijkheden zijn:

- natuurlijke populaties
- gekweekte algensoorten
 - algemeen voorkomende soorten geïsoleerd uit het te toetsen water
 - soort uit een bestaande verzameling.

Bij het werken zowel met natuurlijke populaties als met dominerende algensoorten geïsoleerd uit het te toetsen water doen zich problemen voor. In beide gevallen worden de soorten of de samenstelling van de ent bepaald door een aantal factoren, o.a. het seizoen. Standaardisatie van de ent is dan niet mogelijk. Ook is de toets dan slechts binnen een beperkte tijd te reproduceren. Een ander nadeel is dat algengroei-potentiewaarden van verschillende wateren onderling niet vergelijkbaar zijn, omdat deze met behulp van onderling verschillende algen verkregen zijn.

De Werkgroep Eutrofiëringstoets⁴ gaf de voorkeur aan het werken met één algensoort, gekweekt in het laboratorium. Eisen waaraan een dergelijke soort moet voldoen zijn:

- algemeen vóórkomen in het Nederlandse oppervlaktewater
- eenvoudig te kweken, met een hoge opbrengst
- liefst ééncellig en solitair
- weinig variatie in morfologie en afmetingen
- een snelle en duidelijke reactie bij variaties in het nutriëntengehalte in het kweekmedium
- onder identieke proefomstandigheden een reproduceerbaar gedrag vertonen.

Gezien dit aantal eisen is het moeilijk één soort te vinden die aan alle eisen voldoet. Gezocht is in de klasse der Chlorophyceae (groenwieren) naar soorten die aan een aantal van deze eisen voldoen. Dit zijn:

- *Scenedesmus quadricauda*
- *Selenastrum capricornutum*

Voor een algengroei-potentietoets voor Nederlands oppervlaktewater zijn de belangrijkste eisen:

- een snelle en duidelijke reactie bij variaties in het nutriëntengehalte i.e. stikstof- en fosforverbindingen;
- algemeen voorkomend in Nederlands oppervlaktewater.

Het onderzoek heeft zich op deze twee eisen gericht.

5.2 Reactie op variaties in het nutriëntengehalte

5.2.1 *experimenteel*

In eutrofiëringsonderzoek zijn stikstof en fosfor de belangrijkste nutriënten. De algen zijn gekweekt op het medium Z8⁵; (bijlage 1, p. 73), op 10% van de normale sterkte met verschillende concentraties

stikstof of fosfor. In beide gevallen zijn de gehalten aan Ca^{2+} -, Na^+ - en K^+ -ionen aangevuld tot het niveau van het medium.

De kweekomstandigheden waren:

constante temperatuur $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
continue belichting 24 W/m^2 , TL nr.33
constante menging 80 rpm

Onder deze omstandigheden zijn alle proeven uitgevoerd, tenzij anders vermeld. De groei is dagelijks gevolgd door middel van het meten van optische dichtheid bij 750 nm (OD_{750}).

5.2.2 stikstofverbindingen

De volgende concentraties stikstof zijn, in de vorm van NaNO_3 toegevoegd aan het medium:

0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 mg NO_3^- -N/l

De groeicurven van de twee algensoorten zijn weergegeven in figuur 1.

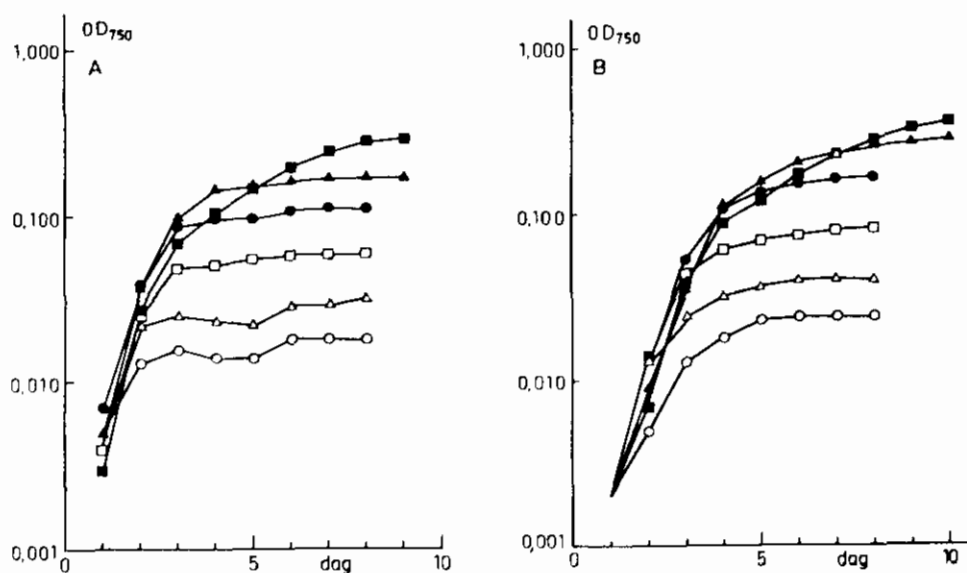


Fig. 1. Groeicurven van Scenedesmus quadricauda (A) en Selenastrum capricornutum (B) gekweekt bij verschillende concentraties NO_3^- -N

(○: 0,1 mg N/l; △: 0,2 mg N/l; □: 0,4 mg N/l; ●: 0,8 mg N/l; ▲: 1,6 mg N/l; ■: 3,2 mg N/l)

In figuur 2 is de relatie tussen de stikstofconcentratie en het biovolume weergegeven.

De correlatiecoëfficiënten voor deze relatie zijn:

Scenedesmus quadricauda $r: 0,998$ voor $0,0 - 3,2 \text{ mg } \text{NO}_3^-$ -N/l

Selenastrum capricornutum $r: 0,996$ voor $0,0 - 1,6 \text{ mg } \text{NO}_3^-$ -N/l

In het gebruikte medium is het fosforgehalte $0,55 \text{ mg P/l}$. Uitgaande van de literatuurgegevens dat bij een verhouding $\text{N:P} < 8$ stikstof de groeibeperkende factor is, zou er een evenredige toename aan biomassa moeten plaatsvinden tot een stikstofgehalte van $4,4 \text{ mg N/l}$ bereikt is⁶. Uit de resultaten valt af te leiden dat in dit onderzoek

Selenastrum capricornutum van deze regel afwijkt. Scenedesmus quadricauda voldoet beter.

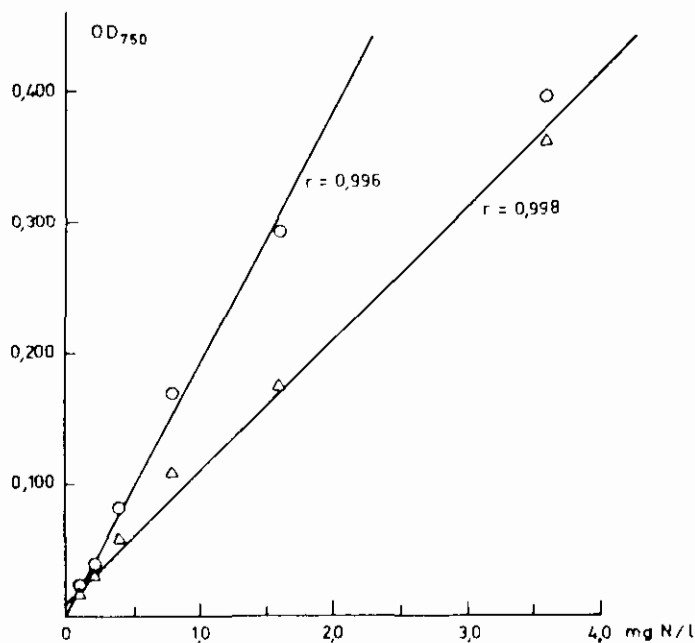


Fig. 2. Relatie tussen het gehalte aan NO₃⁻-N (mg/l) in het medium en het maximale biovolume (OD₇₅₀)

Δ : Scenedesmus quadricauda
 O : Selenastrum capricornutum

5.2.3 fosforverbindingen

De volgende concentraties fosfor zijn, in de vorm van KH₂PO₄ aan het medium toegevoegd:

0,0 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,2 - 1,6 - 2,0 mg PO₄³⁻-P/l.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 3.

Het maximale biovolume, uitgedrukt in OD₇₅₀, uitgezet tegen het fosforgehalte levert het volgende beeld op (fig. 4).

Berekening van de correlatiecoëfficiënten levert de volgende waarden op:

Scenedesmus quadricauda r: 0,953 voor 0,0 - < 0,4 mg PO₄³⁻-P/l
 Selenastrum capricornutum r: 0,946 voor 0,0 - < 0,4 mg PO₄³⁻-P/l

In het gebruikte medium wordt de groei tot een fosforgehalte van 0,40 mg P/l door P bepaald. Dit betekent dat bij een verhouding N:P ≥ 20 fosfor de groeibeperkende factor is (N: 8,4 mg/l; P < 0,4 mg/l). Ook literatuurgegevens wijzen in deze richting⁶.

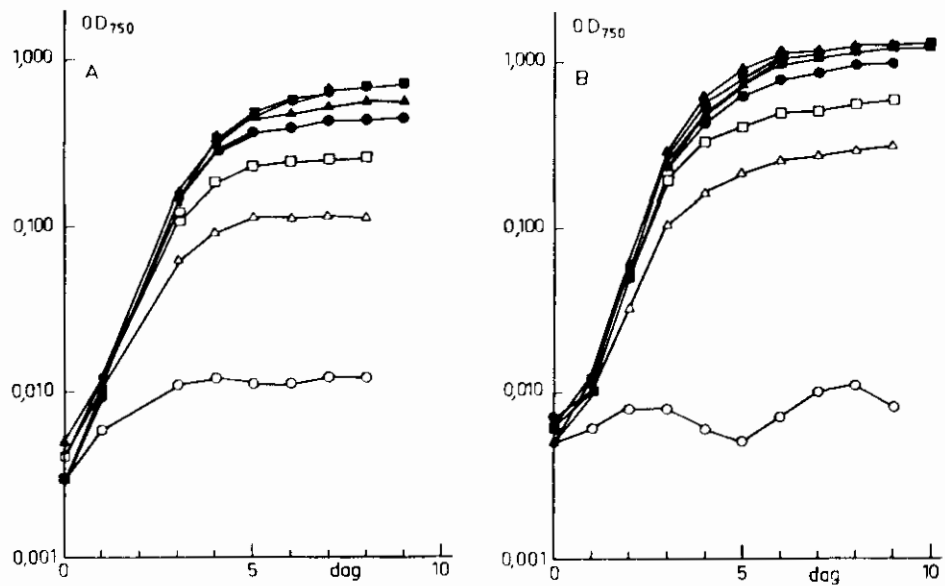


Fig. 3. Groeicurven van *Scenedesmus quadricauda* (A) en *Selenastrum capricornutum* (B) gekweekt bij verschillende concentraties PO₄³⁻-P

○ : 0,00 mg P/l	△ : 0,05 mg P/l	□ : 0,1 mg P/l
● : 0,2 mg P/l	▲ : 0,4 mg P/l	■ : 0,8 mg P/l
⊙ : 1,2 mg P/l	⬤ : 1,6 mg P/l	◼ : 3,2 mg P/l

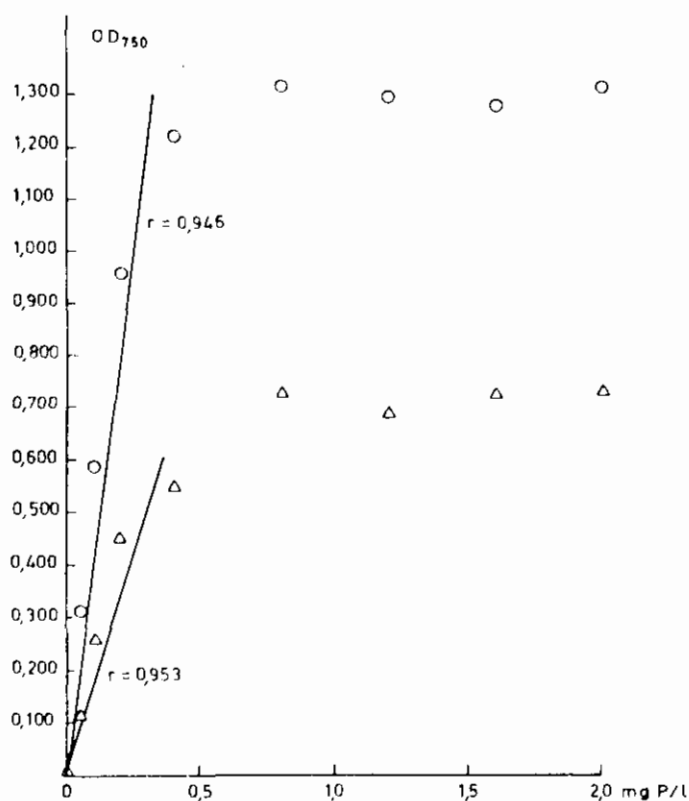


Fig. 4. Relatie tussen het gehalte aan PO₄³⁻-P (mg/l) en het maximale biovolume (uitgedrukt in OD₇₅₀)

Δ : *Scenedesmus quadricauda*
 O : *Selenastrum capricornutum*

5.3 Representativiteit voor het Nederlandse oppervlaktewater

Voor het onderzoek naar het voorkomen van de twee algensoorten in Nederland is gebruik gemaakt van "Index van namen en vindplaatsen die betrekking hebben op in Nederlandse wateren aangetroffen algen en enige groepen van microorganismen"⁷ en van enkele jaarverslagen van waterkwaliteitsbeheerders die in hun gebied uitgebreide fytoplanktonanalyses uitvoeren^{1, 17}.

5.3.1 resultaten

Dresscher⁷ heeft de plaatsen van fytoplanktononderzoek in Nederland geografisch gerangschikt. Op deze wijze zijn er 46 districten ontstaan. *Sc. quadricauda* is in 38 districten aangetroffen, *Sc. capricornutum* slechts in 4 districten.

In de periode 1977-1978 heeft het Hoogheemraadschap van de Uitwaterende Sluizen in Kennemerland en Westfriesland frequent fytoplanktonanalyses uitgevoerd¹. Het aantal malen dat de twee soorten zijn aangetroffen en het gemiddelde aantal over het seizoen is weergegeven in tabel 23.

boezemwater					
	aantal monsterpunten		aantal monsters per punt		gem. aantal toetsalgen per monster
	totaal	met toetsalg	totaal	met toetsalg	
Scenedesmus quadricauda	15	15	12	9 - 12	36
Selenastrum capricornutum	15	14	12	0 - 4	2,1
polderwater					
	aantal monsterpunten		aantal monsters per punt		gem. aantal toetsalgen per monster
	totaal	met toetsalg	totaal	met toetsalg	
Scenedesmus quadricauda	22	21	11	5 - 11	9,2
Selenastrum capricornutum	22	17	11	0 - 4	3,3

Tabel 23. Frequentie van voorkomen en gemiddeld aantal per monster van Scenedesmus quadricauda en Selenastrum capricornutum

De laatste jaren zijn deze verhoudingen niet of nauwelijks veranderd. In de wateren die geanalyseerd worden door het Hoogheemraadschap van Rijnland is in de periode 1977-1978¹⁷ *S. capricornutum* niet aangetroffen. Ook in recenter onderzoek is dit het geval. *Sc. quadricauda* komt wel voor. Uit gegevens van Provinciale Waterstaat Friesland⁴ komt eenzelfde beeld naar voren.

5.4 Eindconclusies keuze toetsalg

- Bij toename van het stikstof- of fosforgehalte in het medium is de toename van het biovolume uitgedrukt in OD_{75%}, bij *Scenedesmus quadricauda* kleiner dan bij *Selenastrum capricornutum*. *Scenedesmus quadricauda* geeft echter bij hogere stikstofgehalten nog een toename in biomassa te zien.
- Uit veldonderzoek blijkt dat van de twee onderzochte soorten *Scenedesmus quadricauda* frequent voorkomt, zowel in plaats als in tijd.
- Gekozen is voor *Scenedesmus quadricauda* als toetsalg. Deze keuze wordt ondersteund door enkele eigenschappen, waargenomen bij ander onderzoek uitgevoerd in het kader van dit projekt. Zo blijkt deze soort minder gevoelig te zijn voor een lage pH (pH < 7) en voor de concentratie aan zware metalen in het medium.

6 KWEEKOMSTANDIGHEDEN

6.1 Inleiding

De groei van algen is niet alleen afhankelijk van het nutriëntengehalte van het aangeboden water. Ook de omstandigheden waaronder de toets wordt uitgevoerd, beïnvloeden de groei. In dit kader zijn temperatuur, licht en de mogelijkheid tot CO₂-suppletie van wezenlijke betekenis. De algengroei-potentiewaarden dienen echter eenduidig de waterkwaliteit weer te geven. Andere factoren, zoals die hierboven genoemd, mogen deze waarden niet beïnvloeden. Standardisatie van de kweekomstandigheden is derhalve noodzakelijk.

Om binnen een redelijke tijd een reactie op het te beoordelen water te verkrijgen is een niet te lage temperatuur te verkiezen. Op grond van eigen ervaring en literatuurgegevens, heeft de Werkgroep Eutrofiëringstoets² gekozen voor 20° ± 1°C. Deze waarde is in dit onderzoek aangehouden.

Bij het kweken van algen in het laboratorium zijn naast de lichtintensiteit ook de belichtingsduur en de spectrale samenstelling van het licht van wezenlijke betekenis. Vermeden dient te worden dat licht in de toets de beperkende faktor wordt. Evenwel dient een te hoge lichtintensiteit vermeden te worden omdat deze kan leiden tot mogelijke schade aan cellen of groeiremming. Gekozen is voor een lichtintensiteit van 24 W/m², gemeten buiten het kweekvat op vloei-stofniveau³.

Onderzoek naar de invloed van continue of periodieke belichting op de groei van *Scenedesmus quadricauda* heeft uitgewezen dat het tijdstip waarop de stationaire fase bereikt wordt, niet wordt beïnvloed door de belichtingsritmiek. Bij continue belichting ontstaan er echter geen synchrone culturen. Derhalve is gekozen voor continue belichting⁴.

6.2 Spectrale samenstelling van het licht

Uit literatuuronderzoek blijkt dat de typen lampen die bij algengroei-potentietoetsen gebruikt worden de TL-buizen nr. 32, 33, 55 en 57 zijn of combinaties hiervan^{5, 16, 21}. Het type TL-33 heeft enige voordelen boven de anderen. Het bevat voldoende rood en blauw licht en dit in de goede verhouding om als lichtbron bij het kweken van algen te dienen. Om toetsresultaten onderling, ook over langere tijd, te kunnen vergelijken moet de apparatuur die bij de uitvoering van algengroei-potentietoetsen gebruikt wordt over een lange periode beschikbaar zijn. In verband met de ontwikkeling van nieuwe typen TL-buizen en met veranderingen in de produktie van de huidige typen is er onderzoek uitgevoerd naar de invloed van deze nieuwe typen op de groei van algen.

6.2.1 Experimenteel

In een vergelijkend onderzoek is de invloed van de typen TL-33, TL-93 en TL-94 op de groei nagegaan. TL-93 en 94 zouden TL-33 kunnen vervangen. Dit onderzoek is bij constante temperatuur, menging en continue belichting uitgevoerd. Dagelijks is de groei gemeten als OD₇₁₅. Aan het einde van de proef zijn ook drooggewicht en éénmaal het chlorofyl-a-gehalte bepaald.

6.2.2 resultaten en bespreking

De proef is tweemaal uitgevoerd. De resultaten van beide series worden weergegeven in tabel 25.

In figuur 5 zijn de groeicurven van de beide proeven uitgezet. Uit tabel 25 blijkt dat de resultaten van de maximale biomassa's onderling weinig verschillen. Uit de groeicurven is ook geen effect op het verloop van groei in de cultuur af te lezen.

type TL-buis	maximale biomassa									
	biovolume OD ₇₅₀			drooggewicht(mg/l)			chlorofylgehalte(µg/l)			
	gem.	S	n	gem.	S	n	gem.	S	n	
A										
33	0,647	0,030	4	324	2	2	448	16	2	
93	0,618	0,018	4	326	0	2	462	16	2	
94	0,667	0,011	4	345	4	2	462	36	2	
B										
33	0,713	0,023	4	371	13	4				
93	0,729	0,017	4	388	9	4				
94	0,738	0,040	4	388	14	4				

Tabel 25. Maximale biomassa van Scenedesmus quadricauda verkregen bij belichting met verschillende typen TL-buizen

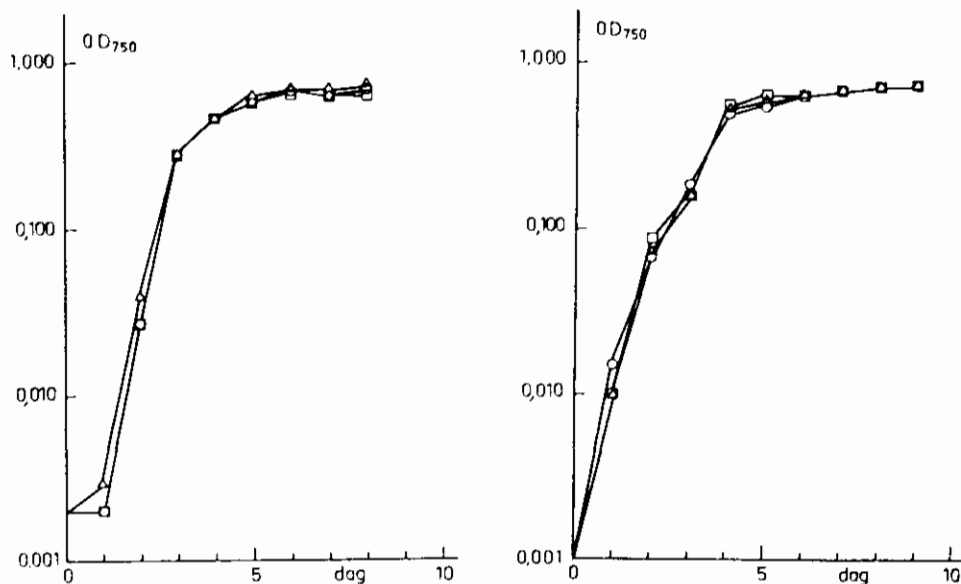


Fig. 5. Groeicurven van Scenedesmus quadricauda gekweekt bij licht, verschillend in spectrale samenstelling

(○ : TL-buis 33; □ : TL-buis 93; △ : TL-buis 94)

6.3 CO₂-voorziening in batchcultures van algen

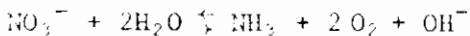
6.3.1 *inleiding*

Een goede CO₂-voorziening in een algenculture is van belang vanwege het gebruik van anorganisch koolstof door de algen tijdens de groei. Daarnaast hebben de evenwichten tussen de anorganische koolstofverbindingen een grote invloed op de buffercapaciteit van het medium en daarmee op de heersende pH. De bufferende werking van de carbonaatevenwichten berust op de volgende reacties:



Een beperking van de pH-stijging is gewenst in verband met de mogelijke invloed van een te hoge pH op de beschikbaarheid van nutriënten voor algen. Ook bij de internationale standaardisatie van de toxiciteitstoets met algen wordt hiervoor gepleit.

Bij opname van nitraat door de algen stijgt de pH²⁷ omdat daarbij OH⁻-ionen vrijkomen volgens:



In een systeem waarin de opname van CO₂ door algen kleiner of gelijk is aan de CO₂-aanvoer vanuit de atmosfeer zal de pH-stijging beperkt blijven door de bufferende werking van het carbonaatsysteem. Als in een snelgroeiende algenculture de opname van CO₂ door de algen groter is dan de aanvoer worden de carbonaatevenwichten verstoord. De bufferende werking van het carbonaatsysteem is dan gering. Bovendien wordt een deel van het HCO₃⁻ via: HCO₃⁻ → CO₂ + OH⁻ omgezet in CO₂ dat door de algen wordt geconsumeerd. Hierdoor zal de pH nog verder stijgen. Bij een hoge pH wordt bij een gelijkblijvend anorganisch koolstofgehalte (TIC) de oplossing sterk onderverzadigd ten opzichte van de CO₂-evenwichtsconcentratie. Dit vergroot de aanvoersnelheid vanuit de atmosfeer. Zodra deze groter is dan de opnamesnelheid van CO₂ door de algen zal de pH gaan dalen als gevolg van de omzetting van OH⁻ en CO₂ in HCO₃⁻. De CO₂-aanvoer is dus van belang voor het beperken van de pH-stijging en het op peil houden van het anorganisch koolstofgehalte. Het onderzoek naar de invloed van de CO₂-aanvoer, op in batchcultures gekweekte algen, is toegespitst op drie punten:

1. Wijze van mengen: geen menging, schudden, beluchten.
2. Verhouding tussen het vloeistofoppervlak en het volume in erlenmeyers die voor 20% of 50% van het volume gevuld zijn met medium.
3. De afsluiting van de erlenmeyers door wattenproppen of omgekeerde bekerglazen.

Daarnaast is onderzocht in hoeverre de beginconcentratie aan anorganisch koolstof invloed heeft op de buffercapaciteit van het medium, het verloop van de groei en de maximale biomassaparameters.

6.3.2 *invloed menging*

experimenteel

De toetsalg *Scenedesmus quadricauda* is in 500 ml erlenmeyers gekweekt

die voor 20% of 50% van het volume gevuld zijn (resp. 100 ml en 250 ml) met het medium Z8 op 10% van de normale sterkte (bijlage 1). Van een deel van de erlenmeyers is de inhoud gemengd door schudden met schudmachines (100 rpm) of beluchten door een glascapillair. Verder zijn de tot nu toe gebruikte kweekomstandigheden aangehouden. Tijdens de proef, die in duplo is uitgevoerd, is de pH dagelijks en OD_{750} tweemaal per week gemeten. Aan het eind van de proef is het chlorofyl-a-gehalte bepaald. De resultaten van de meting van pH en OD_{750} staan in figuur 6 en 7 en de resultaten van de chlorofyl-a-bepaling in tabel 26.

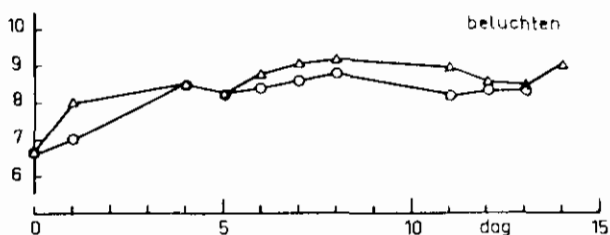
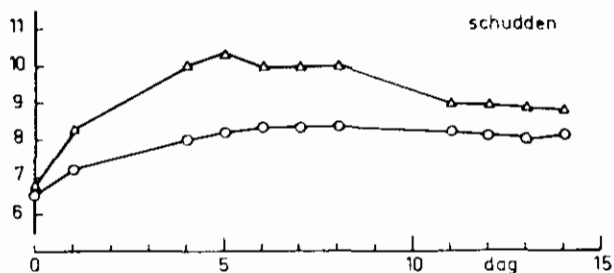
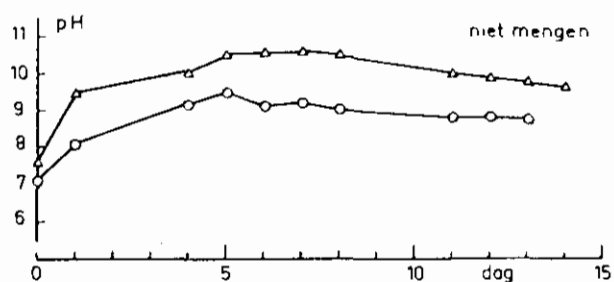


Fig. 6. pH-verloop in de cultures
(O : 20% gevuld; Δ : 50% gevuld)

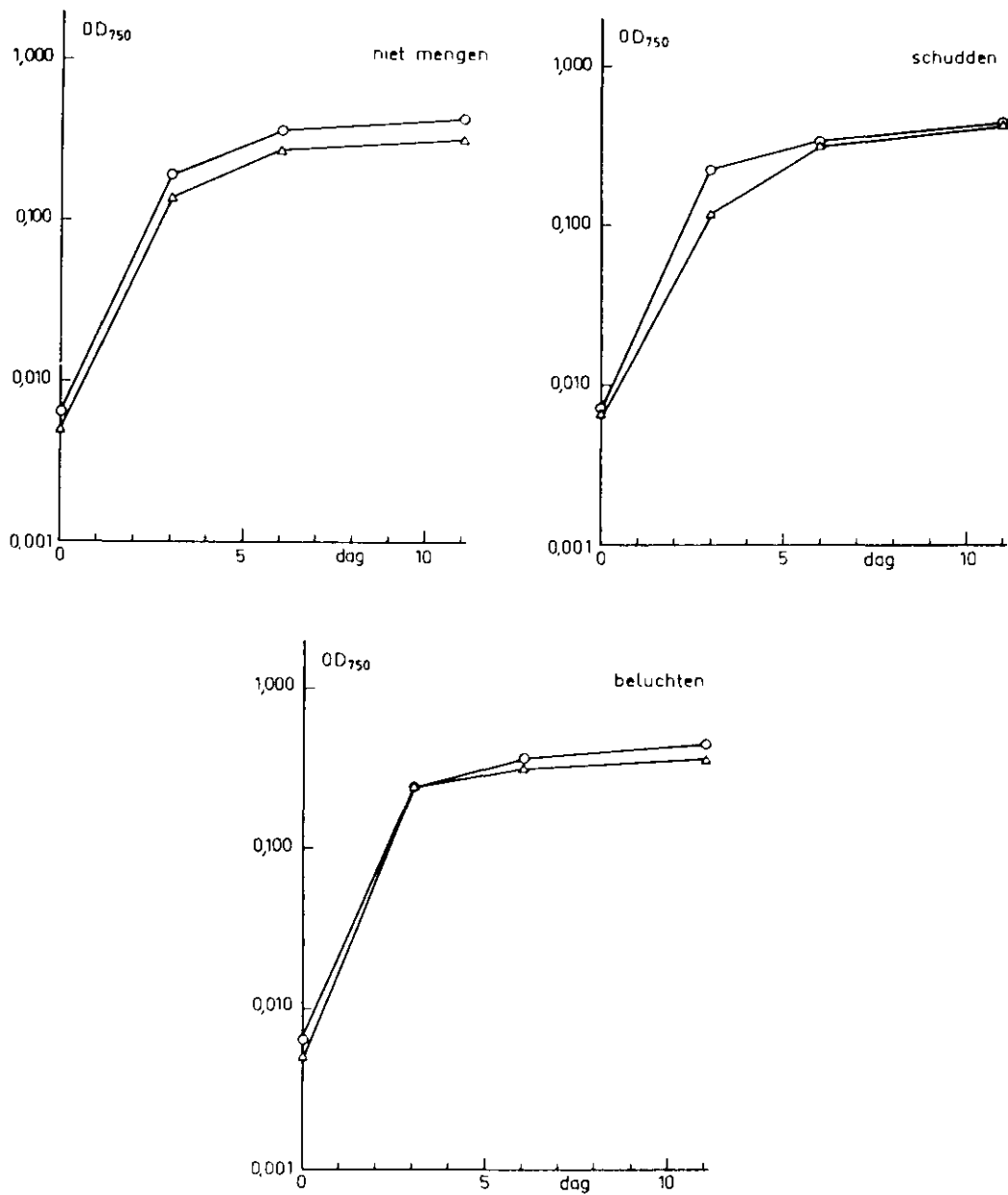


Fig.7. Verloop van de groei gemeten als OD₇₅₀
 (0 : 20% gevuld; Δ : 50% gevuld)

	wijze van mengen			chlorofyl-a- gehalte µg/l
	schudden	beluchten	geen menging	
20% gevuld (100 ml)	X			520
		X		590
			X	590
50% gevuld (250 ml)	X			930
		X		580
			X	720

Tabel 26. Maximale biomassa gemeten als chlorofyl-a-gehalte

resultaten en bespreking

Uit het verloop van de pH blijkt dat deze het meest stabiel is in de voor 20% gevulde erlenmeyers die worden gemengd door schudden. De pH in de andere erlenmeyers loopt op tot hogere waarden; de pH in de beluchte erlenmeyers is instabiel. Het onderlinge verschil in het verloop van de groei en het maximale biovolume (gemeten als OD₇₅₀) is niet groot. Hieruit kan worden afgeleid dat de pH weinig invloed heeft op de groei van de algen in het gebruikte kweekmedium. Opvallend zijn de hogere chlorofyl-a-gehalten in de geschudde en de niet-gemengde 50% cultures ten opzichte van de 20% cultures. Daar de OD₇₅₀ waarden nagenoeg gelijk zijn, kan dit duiden op een hoger chlorofyl-a-gehalte per cel. Als het chlorofyl-a-gehalte per cel beïnvloed kan worden door de pH in de cultuur, dan mag deze slechts weinig variëren.

6.3.3 *verhouding tussen vloeistofoppervlak en volume*

experimenteel

Het onderzoek naar de invloed van de verhouding tussen vloeistofoppervlak en volume is als volgt opgezet: In erlenmeyers van 2000 ml, die voor 20% (400 ml) en 50% (1000 ml) met medium gevuld zijn, is de groenalg *Selenastrum capricornutum* gekweekt op het medium Z8 op 10% van de normale sterkte. De inhoud van de erlenmeyers is gemengd door schudden. De overige kweekomstandigheden waren als bij de vorige proeven. Tijdens de proef zijn pH, OD₇₅₀, TIC en TOC gemeten. De resultaten van de uitgevoerde bepalingen zijn weergegeven in figuur 8.

resultaten en bespreking

Aan het begin van de kweekperiode loopt de pH in alle cultures snel op tot pH 10,6 (figuur 8). Hieruit blijkt dat aan het begin van de groei in geen van de cultures de aanvoer van CO₂ voldoende is. Door een groter oppervlak per volumeëenheid wordt in de voor 20% gevulde erlenmeyers eerder het punt bereikt waarop de aanvoer van CO₂ de opname door de algen overtreft. Daardoor daalt de pH eerder en neemt het TIC-gehalte toe. In de voor 50% gevulde erlenmeyers overtreft de CO₂-aanvoer de opname door de algen pas als de stationaire fase is bereikt. De CO₂-voorziening is dus beter gewaarborgd in de erlenmeyers die voor 20% zijn gevuld dan in de erlenmeyers die voor 50% zijn gevuld. Dit heeft tot gevolg dat in de voor 20% gevulde erlenmeyers

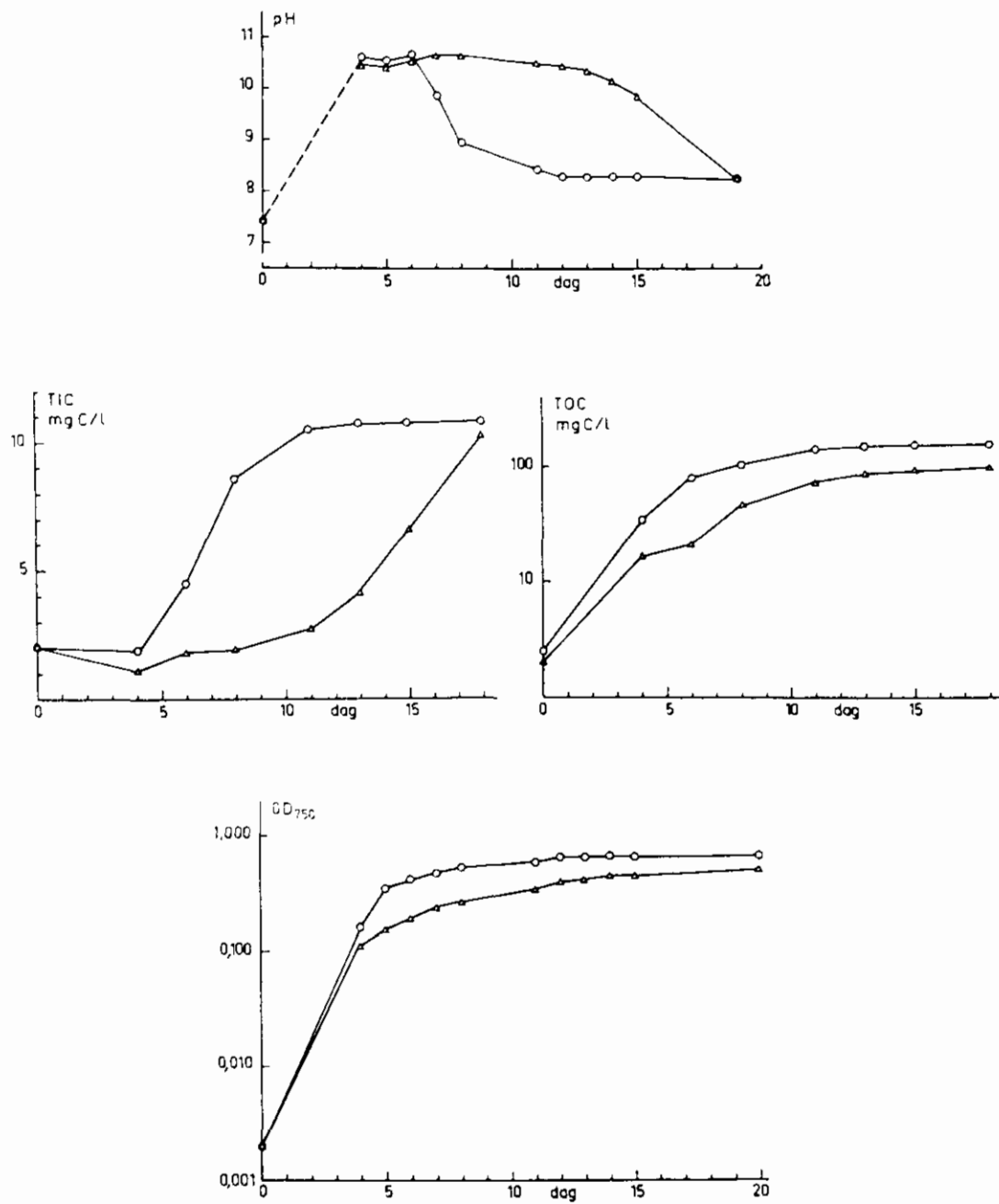


Fig. 8. Verloop van pH, TIC, OD₇₅₀ en TOC, in cultures met een verschillende verhouding tussen oppervlak en volume
 (0 : 20% gevuld; 50 : 50% gevuld)

de stationaire fase eerder wordt bereikt en de maximale biomassa groter is.

Ondanks het feit dat tijdens de groei pH en TIC in de erlenmeyers met een verschillende hoeveelheid medium sterk uiteen lopen, zijn de waarden aan het eind van de proef nagenoeg gelijk. De pH- en TIC-waarden zijn aan het einde van de proef hoger dan bij de start doordat de alkaliniteit ten gevolge van de opname van nitraat door de algen is toegenomen.

Uit de resultaten blijkt dat de door de algen opgenomen hoeveelheid anorganisch koolstof (= hoeveelheid geproduceerd organisch koolstof) veel groter is dan de oorspronkelijk in het medium aanwezige hoeveelheid anorganisch koolstof. Daar ook het gehalte aan TIC groter is aan het einde van de proef moet alle voor de groei benodigde koolstof vanuit de atmosfeer zijn aangevoerd. De resultaten van dit experiment leiden tot de conclusie dat de pH en het TIC-gehalte het best op peil worden gehouden in de erlenmeyers die voor 20% van het volume gevuld zijn. In de erlenmeyers die voor 50% gevuld zijn, blijft de biomassa, gemeten als OD₇₅₀ en TOC achter ten opzichte van de voor 20% gevulde erlenmeyers.

6.3.4 *invloed van de afsluiting van de kweekkolven*

experimenteel

De aanvoer van CO₂ kan worden beïnvloed door de wijze waarop de kweekkolven zijn afgesloten. Om dit te onderzoeken is een proef ingezet waarin voor de afsluiting van de erlenmeyers gebruik wordt gemaakt van de tot nu toe gebruikelijke wattenproppen en van de omgekeerde bekerglazen. De bekerglazen zijn zodanig op de opening van de erlenmeyers geplaatst dat nog een tussenruimte van ongeveer 1 cm over blijft. In deze kolven is *Scenedesmus quadricauda* onder de reeds eerder beschreven omstandigheden gekweekt op Z8-10%. Tijdens de kweekperiode zijn pH, TIC en OD₇₅₀ dagelijks bepaald en TOC, chlorofyl-a-gehalte en drooggewicht aan het einde van de proef. De resultaten van de metingen zijn uitgezet in figuur 9. Belangrijke punten in het verloop van pH, TIC en de maximale biomassaparameters (TOC, OD₇₅₀, chlorofyl-a-gehalte en drooggewicht) staan vermeld in tabel 27.

resultaten en bespreking

In de cultures gekweekt onder omgekeerde bekerglazen is het pH-maximum duidelijk lager dan in de cultures gekweekt onder wattenproppen. Bovendien treedt er in die cultures geen TIC-minimum op. Hieruit kan worden afgeleid dat de CO₂-aanvoer bij het gebruik van wattenproppen wordt belemmerd. Als omgekeerde bekerglazen worden gebruikt voor de afsluiting is de CO₂-aanvoer tenminste gelijk aan de opname door de algen. Dit komt tot uiting in het feit dat er zich in de cultures gekweekt onder omgekeerde bekerglazen geen TIC-minimum voordoet. De pH neemt hier toe onder invloed van de opname van nitraat door de algen, niet door onttrekking van CO₂ aan de carbonaat-evenwichten. De toename van de pH blijft daardoor beperkt. Bij het gebruik van omgekeerde bekerglazen in plaats van wattenproppen bestaat een grotere kans op infecties. Bij de proeven die hiermee tot nu toe zijn uitgevoerd zijn echter geen merkbare infecties opgetreden.

De resultaten van dit experiment geven aan dat de toepassing van omgekeerde bekersglazen als afsluiting van de erlenmeyers de voorkeur verdient boven wattenproppen.

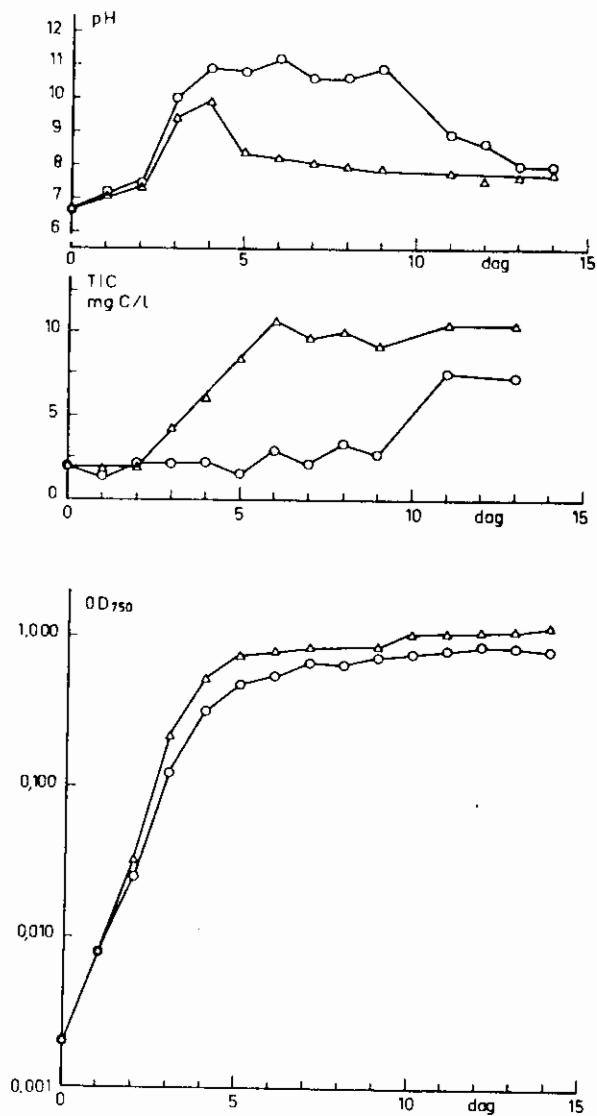


Fig. 9. Verloop van de pH, TIC en OD₇₅₀ in cultuur van *Scenedesmus quadricauda* gekweekt op Z8-10% onder een wattenprop (O) en onder een omgekeerd bekersglas (Δ)

		Scenedesmus quadricauda	
		wattenprop	bekerglas
pH	begin	6,7	6,7
	eind	8,1	8,1
	maximum	11	9,8
	(dag)	(6)	(4)
TIC mg/l	begin	2,0	2,0
	eind	7,4	10
	minimum	1,6	2,0
	(dag)	(5)	(0)
TOC	mg/l	181	285
OD ₇₅₀	eind	0,810	1,050
chlorofyl-a	µg/l	780	360
drooggewicht	mg/l	320	564

Tabel 27. Invloed van de afsluiting van de erlenmeyers

6.3.5 *de beginconcentratie aan anorganisch koolstof* experimenteel

In 2000 ml erlenmeyers die voor 20% van het volume gevuld zijn met medium is de invloed van de beginconcentratie aan anorganisch koolstof op de groei van algen in batchcultures bepaald.

De toetsalgen zijn gekweekt op medium Z8 op 10% van de normale sterkte met 0 - 8,4 - 42, 84 - 150 en 336 mg NaHCO₃/l als anorganische koolstofbron.

Tijdens deze proef zijn de volgende metingen verricht:

- OD₇₅₀ dagelijks
- pH en TIC dagelijks tot het eind van de exponentiële fase daarna om de dag
- chlorofyl-a, drooggewicht en TOC na afloop van de proef.

resultaten en bespreking

De veranderingen van de pH, TIC en OD₇₅₀ lopen ongeveer parallel in de media met verschillende beginconcentraties aan anorganisch koolstof. In figuur 10 is het verloop van deze parameters weergegeven in de culture met 42 mg NaHCO₃/l. In tabel 28 zijn de belangrijkste punten in het verloop van de verschillende parameters opgesomd.

Door de snelgroeïende algen wordt de CO₂-concentratie tot een zo lage concentratie teruggebracht dat de carbonaatevenwichten worden verstoord, waardoor het bufferend vermogen verloren gaat en de pH kan oplopen tot hoge waarden. De beginconcentratie aan anorganisch koolstof heeft hierop geen invloed.

Het belangrijkste gevolg van een hogere NaHCO₃-concentratie is dat de pH bij het begin van de cultuur en de maximum pH hoger komen te liggen. Hieruit volgt dat in synthetische media de NaHCO₃-beginconcentratie gebruikt kan worden om de pH aan het begin van een cultuur te beïnvloeden. De grootste invloed hiervan op de algen wordt

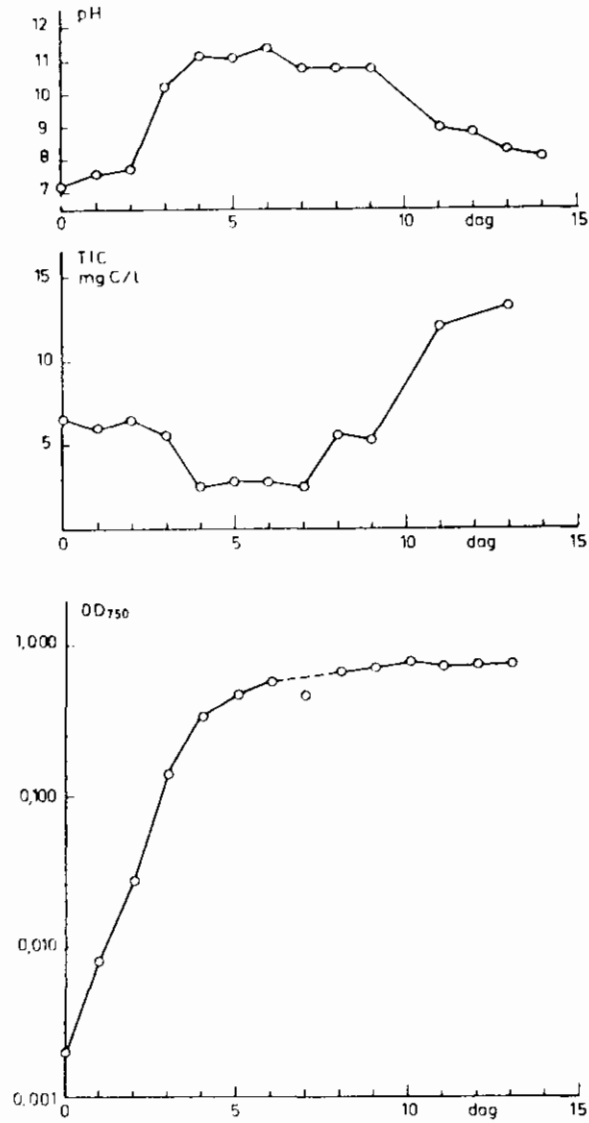


Fig. 10. Verloop van pH, TIC en OD₇₅₀ in cultures van Scenedesmus quadricauda gekweekt op 28-10% met een NaHCO₃-beginconcentratie van 42 mg/l

gevonden in de maximale biomassa gemeten als TOC. Deze verschillen zijn echter niet terug te vinden in andere maximale biomassaparameters. Waarschijnlijk is een deel van het TOC niet in de algen gebonden maar in opgeloste vorm aanwezig. De beginconcentratie aan anorganisch koolstof heeft de kleinste invloed als de maximale biomassa wordt gemeten als OD₇₅₀.

De conclusie die uit dit experiment kan worden getrokken is dat de beginconcentratie aan anorganisch koolstof weinig invloed heeft op de groei van de algen en het bufferend vermogen van het medium tijdens de exponentiële fase van de groei.

		toegevoegd NaHCO ₃ in mg/l					
		0	8,4	42	84	150	336
pH	begin	5,5	6,7	7,2	8,1	9,2	9,6
	eind	8,0	8,1	8,2	8,4	8,7	9,0
	maximum	11	11	11	12	12	12
	(dag)	(6)	(6)	(6)	(6)	(4-6)	(4)
TIC mg/l	begin	0,5	2,0	6,5	11	21	42
	eind	7,6	7,4	13	20	27	53
	minimum	0,3	1,6	2,5	4,0	4,5	19
	(dag)	(2)	(5)	(4-7)	(5)	(4)	(4)
TOC	eind mg/l	94	181	258	234	223	178
OD ₇₅₀	eind	0,751	0,810	0,740	0,754	0,721	0,774
chlorofyl-a	µg/l	810	780	750	880	920	610
drooggewicht	mg/l	295	320	315	364	358	379

Tabel 28. Invloed van de NaHCO₃-beginconcentratie op de groei van Scenedesmus quadricauda

6.4 Eindconclusies kweekomstandigheden

- Enkele kweekomstandigheden waren reeds bekend:
 temperatuur 20° ± 1°C
 belichting continue 24 W/m²
- TL-buizen nr.33 of een equivalent ervan kunnen voor de belichting gebruikt worden.
- Voor een goede CO₂-voorziening in de cultures is zowel een goede menging als een groot oppervlak per volumeëenheid noodzakelijk. Op grond hiervan is gekozen voor:
 - vullen van de erlenmeyers met medium tot maximaal 20% van het volume;
 - menging door middel van schudden;
 - afsluiting van de erlenmeyers door omgekeerde bekerglazen.
- Een hoge beginconcentratie aan anorganisch koolstof kan niet voorkomen dat de pH bij onvoldoende aanvoer van CO₂ oploopt tot hoge waarden.
 In synthetische media kan de beginconcentratie aan NaHCO₃ gebruikt worden om de pH aan het begin van een cultuur te beïnvloeden.

7 ENT EN ENTVOORBEREIDING

7.1 Nutriëntengehalte van het kweekmedium

7.1.1 *inleiding*

Bij algengroei-potentietoetsen mag de toename van de biomassa alleen een reactie zijn op de in het te toetsen water aanwezige nutriënten. Andere factoren moeten worden uitgesloten. Daarom is het van belang de cultuur waaruit de ent onttrokken wordt, de zogenaamde voorcultuur, onder zodanige omstandigheden te kweken dat deze niet de groei van de algen in de algengroei-potentietoets beïnvloeden. Om reeds de eerste dagen van de toets een reactie te krijgen op het nutriëntengehalte van het te toetsen water moet "luxury uptake" van o.a. fosfor door de algen voorkomen worden⁵. Ook is er kans dat door het gebruik van een kweekmedium met hoge stikstof en fosforconcentratie bij het enten het gehalte aan deze stoffen in het te toetsen water beïnvloed wordt, niet denkbeeldig. Zeker gezien de hoge concentratie nutriënten waarmee in veel kweekmedia gewerkt wordt²⁹.

Eisen waaraan de voorcultuur moet voldoen zijn:

- geen "luxury uptake" van nutriënten
- een duidelijk onderscheid tussen de verschillende groeifasen in de cultuur
- een lange exponentiële groeifase
- een voldoende tot hoge opbrengst aan algenbiomassa.

De ent voor een algengroei-potentietoets kan het beste onttrokken worden in de exponentiële groeifase van de voorcultuur²⁰.

7.1.2 *experimenteel*

Uit de literatuur^{20,22,27,34} is een groot aantal media bekend, waarop algen gekweekt worden voor eutrofiërings- of toxiciteitstoetsen. In een vergelijkend onderzoek zijn vier media getoetst. Dit zijn media die veel gebruikt worden of in verband met standaardisatie van onderzoeksmethoden ontwikkeld zijn. Deze media zijn:

ISO - International Organization of Standardization (draft method)¹³

Z8 - Skulberg (1964), gemodificeerd⁷

Rodhe VIII - Rodhe (1948), gemodificeerd³⁵

NPR - Nederlandse Praktijk Richtlijn 6505²⁴

De samenstelling van deze media is weergegeven in tabel 29. Gezien de concentratie aan nutriënten is het medium Z8 altijd gebruikt in een verdunde vorm, op 10% van de voorgeschreven sterkte¹⁵.

Voor de beoordeling van de groei zijn de volgende criteria gehanteerd:

- duur van de exponentiële fase (in dagen)
- groeisnelheid in de exponentiële groeifase: $\frac{\ln(x_4/x_0)}{t_4-t_0}$
 - x: biomassa uitgedrukt als OD₇₅₀ op dag 0 (x₀) en op dag 4 (x₄) van de exponentiële groeifase
 - t: tijd, dag 0 (t₀) en dag 4 (t₄) van de exponentiële groeifase
- maximale biomassa, uitgedrukt als OD₇₅₀, drooggewicht (mg/l) en chlorofyl-a-gehalte (µg/l).

De gebruikte parameters zijn:

- OD₇₅₀ dagelijkse meting
- drooggewicht (mg/l) } eind proef
- chlorofyl-a-gehalte (µg/l) }

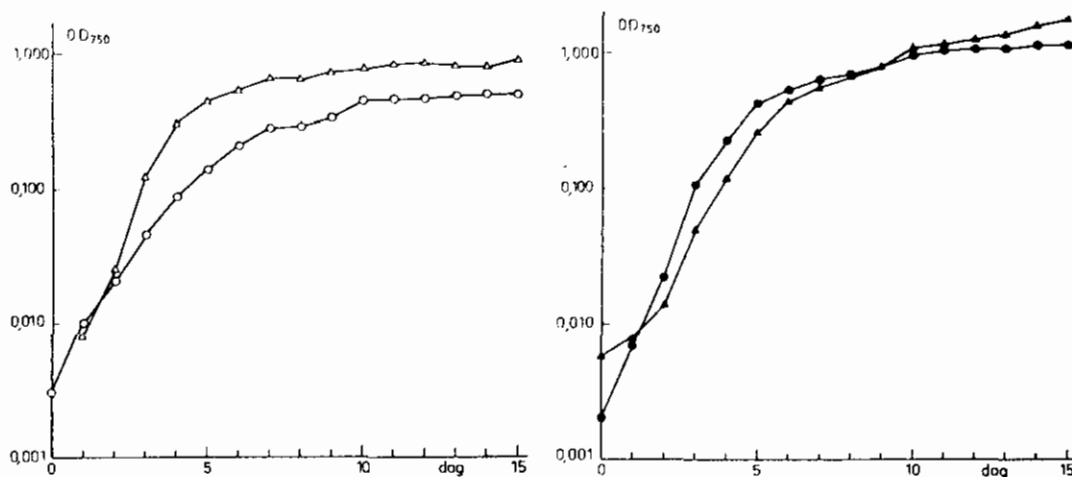
De cultures zijn gekweekt onder de gebruikelijke omstandigheden.

	ISO	Z8-10%	Rodhe VIII	NPR
N	4,0	8,4	10	198
P	0,4	0,6	0,9	7,1
Ca	4,9	1,0	15	9,6
Mg	2,9	0,3	1,0	7,5
Na	44,3	15	7,5	140
K	0,9	0,7	2,2	18
S	2,0	0,3	1,3	9,9
C	21	0,2	-	2,3
Fe	17	0,5	0,2	1,4
N-vorm	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ ; NH ₄ ⁺
complexvormer	EDTA	EDTA	EDTA	citroenzuur
sporen	p.m	p.m	p.m	p.m
N:P	10:1	14:1	11:1	28:1

Tabel 29. Samenstelling van de te onderzoeken media voor het kweken van algen (concentraties in mg/l)

7.1.3 resultaten en bespreking

De groeicurven zijn weergegeven in figuur 11.



Figuur 11. Groeicurve van *Scenedesmus quadricauda* gekweekt op verschillende media

(○: ISO; △: Z8-10%; ●: Rodhe VIII; ▲: NPR)

De resultaten zijn weergegeven in tabel 30. Hieruit blijkt dat de duur van de exponentiële groeifase in de meeste media 4 dagen is, waarna de toename van de algen per dag steeds minder wordt, totdat deze zo gering is ($\leq 5\%$) dat de stationaire fase bereikt is. De duur van de overgangsfase tussen de exponentiële groeifase en de stationaire fase verschilt per cultuur.

medium	duur exp. groeifase (dagen)	groeisnelh. dag 0-4	maximale biomassa				dag
			OD ₇₅₀	d.w. (mg/l)	chlor.a (µg/l)	n	
ISO	4	0,84	0,516	214	275	2	18
Z8-10%	4	1,16	0,827	385	415	2	16
Rodhe VIII	4	1,18	1,230	562	1135	2	18
NPR	2	0,75	7,650	3025	115700	2	39

Tabel 30. Resultaten van de groei van *Scenedesmus quadricauda* op verschillende kweekmedia.

Het beeld van de groei op het NPR-medium wijkt af van dit algemene beeld. Er treedt zelfs een lag-fase op aan het begin van de proef. Gemeten als OD₇₅₀ neemt de algenbiomassa slechts twee dagen exponentieel toe. Daarna treedt er nog wel een toename op, maar niet meer exponentieel. De overgangsfase naar de stationaire fase is lang. De verschillende fasen zijn niet gemakkelijk van elkaar te onderscheiden. Door deze korte exponentiële fase en het ontbreken van een duidelijk onderscheid tussen de verschillende groeifasen voldoet dit medium niet aan twee van de vier geformuleerde eisen.

De maximale algenbiomassa op het NPR-medium is hoog als gevolg van het hoge nutriëntengehalte van het medium. Dit hoge gehalte kan echter aanleiding geven tot extra opname van deze stoffen en tot nutriëntenoverdracht vanuit het medium naar de toets. Bij het kweken op verdund NPR-medium, b.v. op 10% van de voorgeschreven sterkte is dit probleem ondervangen, maar blijft het minder gunstige verloop van de groei op dit medium bestaan. Van de drie andere cultures vertoont degene op het Rodhe VIII-medium de hoogste biomassawaarden. In vergelijking met oppervlaktewater heeft dit medium echter een hoge fosforconcentratie.

Het meest geschikt voor het kweken van voorcultures is het medium Z8 op 10% van de normale sterkte. Het fosforgehalte zal echter teruggebracht moeten worden tot een waarde $\leq 0,40$ mg P/l, omdat dan in dit medium de groei bepaald wordt door het fosforgehalte en de kans op "luxury uptake" gering is.

7.1.4 *Invloed van de verschillende media in de voorcultuur op de reactie van de algen in de algengroei-antiteloets*

Opvallend in tabel 30 is het relatief hoge chlorofylgehalte in de cultuur gekweekt op het medium Rodhe VIII. De optische dichtheid, maat voor het aantal algen, is ook hoger dan in de cultuur gekweekt op Z8-10%, maar niet in die mate. Dit wijst op een hoger chlorofylgehalte per alg. Dit hogere gehalte aan het begin van de proef zou de resultaten kunnen beïnvloeden. Om dit na te gaan is een kleine proef ingezet.

Voorcultures zijn gekweekt op het medium Z8-10% en Rodhe VIII, waarbij het fosforgehalte was teruggebracht tot 5% voor Z8 en 50% voor Rodhe VIII (resp. 0,28 en 0,45 mg P/l). Hoewel ook hier het chlorofyl-gehalte van de cultuur gekweekt op het medium Rodhe VIII 50% hoger was dan dat van de cultuur gekweekt op het medium Z8, bleken de eindwaarden voor chlorofyl, drooggewicht en optische dichtheid van cultures geënt met deze algen onderling niet of nauwelijks te verschillen. Ook was er geen verschil in het tijdstip waarop de stationaire fase werd bereikt.

7.2 Entconcentratie

De ent in de toets moet een zodanige hoeveelheid algen bevatten dat met de te gebruiken meetmethoden binnen één à twee dagen een reactie van de algen gemeten kan worden op een eenvoudige manier, met bijvoorbeeld OD_{750} .

Het aantal algen in de voorcultuur wordt bepaald aan de hand van tellingen uitgevoerd met behulp van een microscoop. Bij *Scenedesmus quadricauda* gaat men uit van cellen niet van coenobia.

Goede resultaten zijn bereikt met een zodanige ent dat de beginconcentratie in de kweekkolf 2×10^7 cellen/l bedraagt.

7.3 Steriliteit

De voorcultuur van *Scenedesmus quadricauda* hoeft voor een algengroei-potentietoets niet bacterievrij te zijn. Wel moet er voor gezorgd worden dat men in de toets alleen de reactie van de algen meet. De toename van bacteriën moet voorkomen worden. Daarom is het beslist noodzakelijk om onder steriele omstandigheden en met gesteriliseerd materiaal te werken.

7.4 Eindconclusies ent en entvoorbereiding

- Cultures gekweekt op het medium Z8 op 10% van de normale sterkte, voldoen aan de eisen gesteld aan voorcultures voor algengroei-potentietoetsen. Het fosforgehalte moet echter wel aangepast worden aan het gehalte dat in het te toetsen water verwacht wordt.
- De ent moet zodanig zijn dat de beginconcentratie in de kweekkolven 2×10^7 cel/l bedraagt.
- Werken onder steriele omstandigheden en met gesteriliseerd materiaal is noodzakelijk om de reactie van alleen de toetsalgen te meten.

8.1 Inleiding

Bij toxiciteitstoetsen wordt voor het meten van de reactie van de toetsalg op het aangeboden te beoordelen water de remming van de groeisnelheid als basis gebruikt²². De groeisnelheid van organismen wordt beïnvloed door groeiremmende (toxische) stoffen en door groei-stimulerende stoffen, nutriënten. Wil men de groeisnelheid als maat voor de reactie gebruiken, dan moeten de concentraties van de te toetsen stoffen gedurende de periode waarover de groeisnelheid berekend wordt, gelijk blijven. Bij algengroei-potentietoetsen, uitgevoerd in batch-cultures, is dit niet het geval. De te toetsen stoffen, o.a. stikstof- en fosforverbindingen worden gedurende de toets verbruikt door de algen. Daarom kan in deze toets, waarin de groeistimulerende werking van oppervlakte- en afvalwater wordt bepaald, niet de groeisnelheid als maat voor de responsie gebruikt worden²³. De maximale biomassa is een betere maat. De wijze waarop deze bereikt wordt, kan verschillen, maar kan worden afgelezen uit de vorm van de groei-curve. Daarom zou ook deze vorm in het onderzoek betrokken moeten worden, wat met behulp van een wiskundige beschrijving van de curve mogelijk is.

De maximale biomassa treedt op in de stationaire fase. Om het begin van deze fase goed te kunnen bepalen, moet de groei dagelijks gevolgd worden. Hiervoor is een snelle, eenvoudige methode nodig waarbij slechts een geringe hoeveelheid monster gebruikt wordt. De stationaire fase is bereikt als bij twee opeenvolgende dagelijkse metingen de toename van de groei beide keren $\leq 5\%$ is. Is deze fase bereikt dan moet de biomassa bepaald worden, voordat de afbraak-fase intreedt.

De biomassa kan bepaald worden met behulp van directe en indirecte methoden.

 direkt : drooggewicht (mg/l)
 indirekt : optische dichtheid
 chlorofyl-a-gehalte ($\mu\text{g/l}$)

Een kritische beschouwing van de verschillende methoden is nodig.

8.2 Drooggewicht8.2.1 *experimenteel*

Het drogen van algenmonsters kan uitgevoerd worden door:

- verhitten tot 105°C gedurende 1-2 uur (d.w.)
- vriesdrogen " 24 uur (v.d.)

Analyses zijn uitgevoerd met algen in verschillende stadia van de cultuur en bij verschillende verhoudingen N:P in het medium (28-10%). De algen zijn op de gebruikelijke wijze gekweekt.

8.2.2 *resultaten en bespreking*

De resultaten van deze proef zijn weergegeven in tabel 31.

Bij algen in de exponentiële groeifase is er een duidelijk verschil te zien tussen de resultaten van de beide methoden. Vriesdrogen geeft een hogere opbrengst. Vollenweider³⁶ schrijft dit verschil toe aan het verlies van vluchtige stoffen door verhitten. Het verschil neemt af naarmate de cultuur veroudert. Het gehalte aan

vluchtige stoffen kan afhankelijk zijn van de ouderdom van een cultuur. Daar een parameter als drooggewicht in de meeste gevallen gebruikt zal worden voor een éénmalige meting, in verband met het volume monster dat nodig is voor de meting, zal dit aan het einde van de toets plaatsvinden. De cultuur bevindt zich dan in de stationaire fase zodat het verschil in resultaat tussen de beide methoden gering is. Het bepalen van het drooggewicht door middel van verhitting is echter de meest eenvoudige methode en kan op ieder normaal ingericht chemisch laboratorium uitgevoerd worden, zodat aan deze methode de voorkeur gegeven wordt.

	exponentiële groeifase			stationaire groeifase						n
				begin			eind			
N:P	d.w.	v.d.	%verschil	d.w.	v.d.	%verschil	d.w.	v.d.	%verschil	
< 8	35	43	+23	250	250	0	550	550	0	3
~10	44	50	+14	230	260	+13	520	570	+10	3
>20	45	56	+20	240	240	0	530	560	+6	3

Tabel 31. Resultaten van analyses van drooggewicht (d.w.) en vriesdrooggewicht (v.d.) van *Scenedesmus quadricauda* in verschillende stadia in een cultuur en gekweekt bij verschillende verhoudingen N:P

(d.w. en v.d. in mg/l).

8.3 Optische dichtheid

Onder optische dichtheid van een monster verstaat men de verzwakking van een doervallende lichtbundel als gevolg van lichtverstrooiing en absorptie. Door het aandeel van de absorptie in deze parameter is de gemeten waarde afhankelijk van de golflengte waarbij gemeten wordt.

8.3.1 experimenteel

Om de invloed van absorptie door chlorofyl en andere fotosynthetische pigmenten in de algencellen uit te sluiten, is gekozen voor het meten bij een golflengte > 700 nm². In de literatuur worden 720 nm²² en 750 nm²⁵ genoemd. Monsters uit verschillende cultures zijn gemeten bij deze twee golflengten. De verschillen waren verwaarloosbaar klein. Meten bij λ 750 nm heeft het voordeel dat de afstand tot het gebied waar absorptie door chlorofyl-a kan optreden (650-680 nm) groter is dan bij λ 720. De voorkeur gaat dan ook uit naar meten bij λ 750 nm.

8.4 Chlorofyl-a-gehalte

Voor het bepalen van het chlorofyl-a-gehalte is gebruik gemaakt van het normvoorschrift NEN 6520²³. De spreiding in de resultaten kan groot zijn. In een AGP-toets is de biomassa en ook het chlorofyl-a-gehalte groter dan in oppervlaktewater onder natuurlijke omstandigheden, zodat maar een gering volume (< 100 ml) nodig is om deze analyse uit te voeren. Het gehalte wordt echter berekend in μg per liter, zodat kleine verschillen in meetwaarden na omrekening tot grote spreiding aanleiding kunnen geven. Een ander punt is dat het chlorofyl-a-gehalte, gezien zijn structuur, gevoelig zou kunnen zijn voor

het stikstofgehalte in het water.

8.4.1 *experimenteel*

Aan het medium Z8, op 25% van zijn voorgeschreven sterkte, is stikstof, in de vorm van NO_3^- -N in verschillende concentraties toegevoegd: 8,4 - 16,8 - 21 - 33,6 mg NO_3^- -N/l, overeenkomend met resp. 10 - 20 - 25 - 40% van het oorspronkelijke gehalte. De algen zijn op de gewone manier gekweekt. Tijdens de proef is de groei dagelijks gevolgd door het meten van OD_{750} . Aan het eind van de proef zijn het chlorofyl-a-gehalte en het drooggewicht bepaald.

8.4.2 *resultaten en bespreking*

De groeicurven vertoonden geen afwijkingen. De resultaten van de metingen zijn weergegeven in tabel 32.

	n	N			
		10%	20%	25%	40%
OD_{750}	4	1,403	1,684	1,719	1,771
d.w.	4	684	704	756	792
chlorofyl-a-gehalte	4	1332	2616	4096	4285
chl/ OD_{750}		950	1553	2380	2420
chl/d.w.		1,95	3,7	5,4	5,4
d.w./ OD_{750}		488	418	440	447
N:P		6:1	12:1	15:1	24:1

Tabel 32. Resultaten van de analyses van OD_{750} , drooggewicht (mg/l) en chlorofyl-a-gehalte ($\mu\text{g/l}$) van *Scenedesmus quadricauda*, gekweekt op medium Z8-25% met verschillende stikstofconcentraties

De biomassa's uitgedrukt in OD_{750} of drooggewicht vertonen onderling enig verschil. Het chlorofyl-a-gehalte vertoont echter grote verschillen. Zowel de OD_{750} als het drooggewicht nemen toe bij een toename van het stikstofaanbod. Daar OD_{750} voornamelijk bepaald wordt door het aantal deeltjes kan de waarde d.w./ OD_{750} beschouwd worden als een maat voor de biomassa per alg. Deze waarde vertoont enige variatie, maar niet meer dan 20%. De waarde chl/ OD_{750} , een maat voor het gehalte chlorofyl-a per alg, vertoont een veel grotere variatie. Deze waarde neemt toe bij een toename van het stikstofgehalte in het medium, totdat stikstof niet meer de groeibeperkende factor is ($\text{N:P} > 12$)¹⁹. Deze resultaten worden bevestigd door literatuurgegevens^{19, 20}. Hieruit blijkt dat het chlorofyl-a-gehalte in een toets niet alleen afhankelijk is van het aantal algen, maar ook van het chlorofyl-a-gehalte per cel, een gehalte dat door het stikstofgehalte van het te toetsen water beïnvloed kan worden. Voor algengroei-potentie-toetsen is het chlorofyl-a-gehalte niet geschikt als biomassaparameter.

8.5 Betrouwbaarheid

Bij de keuze van de biomassaparameter is ook de betrouwbaarheid van

de meetmethoden van belang. Om de betrouwbaarheid te bepalen zijn analyses van het drooggewicht en het chlorofylgehalte in enkele fasen van de groei in veelvoud uitgevoerd.

8.5.1 *experimenteel*

De algen zijn gekweekt op de gewone wijze, op Z8-medium op 10% van de voorgeschreven concentratie. De analyses zijn uitgevoerd in:

- exponentiële groeifase (dag 4)
- stationaire groeifase begin (dag 9)
- eind (dag 13)

8.5.2 *resultaten en bespreking*

De resultaten van deze analyses zijn weergegeven in tabel 33. Opvallend is de toename van het drooggewicht en de afname van het chlorofyl-a-gehalte in de stationaire fase. Lettend op de standaarddeviatie kunnen de biomassaparameters het beste bepaald worden aan het begin van de stationaire fase, als de groei bij twee opeenvolgende dagelijkse metingen $\leq 5\%$ is. Uitgedrukt als drooggewicht is dan de maximale biomassa nog niet bereikt. Dit hoeft echter geen probleem te zijn als het afbreken van de toets steeds op hetzelfde goed gedefinieerde moment plaatsvindt.

fase	drooggewicht			chlorofyl-a			n
	gem	S	%	gem	S	%	
exp. groeifase	121	3	2,4				5
stat. fase begin	133	2	1,5	1770	35	2	9
				856	9,5	1,1	9
stat. fase eind	300	11	3,7				7
				574	46	8,0	9

Tabel 33. Resultaten van analyses van drooggewicht (mg/l) en chlorofyl-a-gehalte ($\mu\text{g/l}$) in verschillende fasen van een cultuur van *Scenedesmus quadricauda*

8.6 Eindconclusie methoden om de biomassa te meten

- De meest geschikte parameter om de biomassa in een toets te meten is het drooggewicht, waarbij het drogen plaatsvindt door verhitting (105°C). Wel moet de analyse van deze parameter steeds op hetzelfde tijdstip in de toets plaatsvinden, en wel nadat bij twee opeenvolgende dagelijkse metingen de groei $\leq 5\%$ is.
- De groei gedurende de toets kan gevolgd worden door het meten van OD_{750} . De gevonden waarden zijn echter geen absolute waarden.
- Het chlorofyl-a-gehalte is niet geschikt als biomassaparameter omdat het niet alleen afhankelijk is van de hoeveelheid algen, maar ook van de hoeveelheid chlorofyl-a per cel. Dit laatste gehalte kan variëren, afhankelijk van het stikstofgehalte in het water. Mocht deze parameter als extra parameter worden gebruikt, dan is de betrouwbaarheid voldoende.

9 STATISTISCHE VERWERKING VAN DE GEGEVENS

9.1 Inleiding

Bij de interpretatie van de resultaten van de algengroei-potentie-toets is het belangrijk te weten hoe betrouwbaar de gegevens zijn. Om de betrouwbaarheidsgrenzen te kunnen berekenen moet de standaarddeviatie van de maximale biomassaparameter worden bepaald. Aan de hand van deze gegevens kan een uitspraak worden gedaan hoeveel replica's dienen te worden ingezet om een significant verschil in de maximale biomassaparameter te veroorzaken. Om deze gegevens te verkrijgen zijn algengroei-potentietoetsen met praktijkmonsters in achtvoud ingezet. De monsters zijn onderverdeeld in twee watersoorten: oppervlaktewater (Put van Broeckhoven) en effluent (rwzi TH Delft).

9.2 Experimenteel

Om een eventuele invloed van de plaats van een erlenmeyer op de schudtafels uit te sluiten zijn de erlenmeyers willekeurig over de schudtafels verdeeld. De plaatsing is dagelijks gewijzigd. De groei van de algen is gevolgd door de OD_{715} dagelijks te meten. Van de replica's van een monster zijn de gemiddelde waarde, de procentuele standaarddeviatie en de procentuele toename van het gemiddelde ten opzichte van de voorafgaande dag berekend. Als de toename op twee achtereenvolgende dagen $< 5\%$ bedraagt worden de cultures afgebroken. Dan worden ook drooggewicht (d.w.) en chlorofyl-a-gehalte (chl.a) bepaald, en gemiddelde waarde en standaarddeviatie berekend.

De fysisch-chemische samenstelling van het effluent staat vermeld in tabel 19. Om vorming van een fosfaatneerslag te voorkomen is het monster verdund tot 12,5% van de oorspronkelijke concentratie. De samenstelling van het oppervlaktewatermonster staat in tabel 16.

9.3 Resultaten en bespreking

9.3.1 *maximale biomassa parameters*

De gemiddelde waarden van OD_{715} en de standaarddeviatie van de replica's op de afzonderlijke meetdagen staan vermeld in tabel 34 samen met de maximale biomassa gemeten als drooggewicht en chlorofyl-a-gehalte.

De standaarddeviaties nemen toe aan het begin van de toets. Dit wijst erop dat de groei in de replica's de eerste dagen niet gelijk op gaat. Later worden de verschillen in de replica's kleiner waardoor de standaarddeviaties afnemen. De laatste vier dagen zijn de standaarddeviaties redelijk stabiel.

Voor de berekening van de betrouwbaarheidsgrenzen moet de fout bekend zijn die wordt gemaakt in één meting. Uit de standaarddeviaties van de replica's van één monster kan een schatting gemaakt worden van de meetfout. Door deze schatting wordt een afwijking geïntroduceerd in de berekening van de betrouwbaarheidsgrenzen die echter te verwaarlozen is. De fout in de bepaling van de maximale biomassa in het effluentmonster bedraagt bij OD_{715} 4%, bij drooggewicht 8% en bij het chlorofylgehalte 8%. In het oppervlaktewatermonster met een lage maximale biomassa zijn de fouten relatief

gezien groter, bij OD_{750} 7,5%, bij drooggewicht 9% en bij het chlorofylgehalte 10,5%. De fout in de maximale biomassa in het controle medium is, met uitzondering van de fout in het chlorofylgehalte, kleiner dan de fout in de praktijkmonsters.

dag	effluent 1		oppervlaktewater		controlemedium	
	OD_{750} gem.	s.d. %	OD_{750} gem.	s.d. %	OD_{750} gem.	s.d. %
0	0,010	-	0,010	-	0,007	-
1	0,012	8,6	0,014	26	0,014	-
2	0,073	20,0	0,016	21	0,039	17
3	0,194	12,5	0,034	10	0,143	14
4	0,368	6,7	0,054	6	0,428	9
5	0,493	7,5	0,065	11	0,512	3,5
6	0,706	7,4	0,069	6,4	0,578	4,8
7	0,823	6,6	0,069	6,4	0,602	6,0
8	0,861	7,8			0,639	4,2
9	0,918	3,6			0,647	4,7
10	1,016	3,3			0,660	3,2
11	1,053	5,0				
12	1,089	5,6				
d.w.	478	11	65	4,6	310	5,9
chl.-a	2514	13	112	14	1675	12,5

Tabel 34. Gemiddelde en standaarddeviatie van de biomassaparameters in een effluentmonster, een oppervlaktewatermonster en in het controlemedium (Z8-10%) (d.w. in mg/l; chl.-a in $\mu\text{g/l}$).

9.3.2 *significantiegrenzen*

Met de geschatte fout in de maximale biomassaparameters kan de grenswaarde worden berekend waarboven verschillen in de maximale biomassa significant zijn. Hiervoor is de maximale biomassa gemeten als OD_{750} gekozen omdat de fout hierin kleiner is dan in de bepaling van het drooggewicht of het chlorofylgehalte. Met behulp van de t-test volgens Student (o.a. Sachs³⁶) kunnen de significantiegrenzen worden berekend bij een verschillend aantal replica's. Omdat de fout groter is bij $OD_{750} < 0,1$ dan bij $OD_{750} < 0,3$ zijn voor beide gebieden de significantiegrenzen berekend. Hierbij zijn die grenswaarden gekozen, waarbij de uitspraak dat het verschil in de maximale biomassa is veroorzaakt door verschillen in de samenstelling van de monsters en niet door toevallige variaties, in 95% van de gevallen juist is. In tabel 35 worden de berekende relatieve grenswaarden gegeven bij verschillende aantallen replica's. Om te controleren of een met de toets gevonden verschil significant is moet het verschil worden gedeeld door het gemiddelde van de twee meetwaarden. Het verschil is significant als het berekende quotiënt groter is dan de in de tabel vermelde grenswaarde.

n	OD ₇₅₀ < 0,1	OD ₇₅₀ > 0,3
2	0,47	0,25
3	0,155	0,082
4	0,102	0,054
5	0,080	0,043
6	0,068	0,036
7	0,059	0,032
8	0,054	0,029

Tabel 35. 95% significantiegrenzen bij een verschillend aantal replica's (n) uitgedrukt in verschil/gemiddelde

9.4 Eindconclusies statistische verwerking van de gegevens

- De uit de standaarddeviatie van de maximale biomassaparameters geschatte fout in één meting is het kleinst als de biomassa wordt gemeten als biovolume (OD₇₅₀). De variaties in de bepaling van het drooggewicht en het chlorofyl-a-gehalte zijn groter.
- Een aantal van vier replica's is een redelijk compromis tussen de betrouwbaarheid van de gegevens en de hoeveelheid werk.

10 VOORLOPIG VOORSCHRIFT, PRAKTIJKSITUATIES EN RINGONDERZOEK

10.1 Inleiding

Met de resultaten, verkregen uit de onderzoeken beschreven in de voorgaande hoofdstukken, kunnen verschillende vragen beantwoord worden ten aanzien van

- voorbehandeling van het te toetsen water
- keuze toetsalg
- kweekomstandigheden
- ent en entvoorbereiding
- methoden om biomassa te meten.

Op grond van de uitkomsten van het onderzoek is een voorlopig voorschrift voor standaardisatie van algengroei-potentietoetsen opgesteld (zie bijlage 3). Dit voorschrift is op twee manieren aan een eerste toetsing onderworpen, en wel in

- praktijksituaties met verschillende soorten water
- ringonderzoek tussen drie laboratoria.

10.2 Voorlopig voorschrift voor het uitvoeren van algengroei-potentietoetsen

Bij het opstellen van het voorlopig voorschrift is zoveel mogelijk de opzet van de NEN-normen van het Nederlands Normalisatie Instituut gevolgd.

Wil men het voorschrift voor een dergelijke uitgebreide toets werkbaar houden, dan is het niet mogelijk iedere handeling op eenduidige wijze voor te schrijven. Bij enkele werkzaamheden, zoals het tellen van de algen voor het berekenen van de ent, kan die techniek worden gebruikt die op het instituut van uitvoering gangbaar is. Zo kan men gebruik maken van bacterie-telkamers of plankton-telcuvetten. Ook het type lichtcel waarmee de lichtintensiteit gemeten dient te worden, is niet nader omschreven.

Doordat enkele handelingen niet op eenduidige wijze zijn vastgelegd moet terdege rekening gehouden worden met spreiding in de resultaten van verschillende laboratoria onderling.

10.3 Praktijksituaties

In de periode december 1983 tot juli 1984 zijn enkele malen algengroei-potentietoetsen uitgevoerd met verschillende typen water, zoals oppervlaktewater, effluent van een rwzi en mengmonsters van deze watersoorten.

10.3.1 *experimenteel*

Bij dit onderzoek waren de volgende watertypen betrokken:

oppervlaktewater: Put van Broeckhoven (bij Bodegraven)

Akkerdijkse Plassen (bij Pijnacker)

effluent van de rwzi te Nieuwveen.

van de TH Delft

Gezien de hoge AGP-waarden, verkregen op onverdunde monsters (zie p.30), mogelijk leidend tot het optreden van groeibeperking door een gebrek aan licht, zijn deze proeven uitgevoerd met effluent verdund met gedestilleerd water.

Mengmonsters bestaan uit 10% effluent en 90% oppervlaktewater.

In tabel 36 zijn de resultaten van deze algengroei-potentietoetsen weergegeven.

soort water	maand	pH	N			P		OD ₅₀₀	dw
			NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	LN	PO ₄ ³⁻	TP		
PvB	dec.	8,6	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1	0,070	65
PvB PvB+Nv	april	8,6	<0,05	0,5	0,6	n.d.	<0,05	0,071	55
		9,1	<0,05	1,9	2,0	0,2	0,4	0,317	159
PvB PvB+THD	mei	8,5	<0,05	0,5	0,6	n.d.	<0,05	0,075	41
		9,0	1,7	5,4	7,3	0,1	0,7	0,512	392
AP	febr.	9,6	0,1	0,6	1,8	0,1	0,5	0,173	120
AP AP+Nv	april	9,3	0,1	1,0	1,1	0,1	0,3	0,052	41
		9,1	0,1	1,5	1,7	0,2	0,5	0,291	224
AP AP+THD	juni	9,6	0,9	0,2	1,2	0,1	0,3	0,134	138
		8,3	0,2	1,5	2,1	0,2	0,6	0,512	319
Nv(1:7)	april	9,1	<0,05	2,0	2,1	0,5	0,5	0,328	192
THD(1:7)	mei	6,0	2,7	6,0	9,2	0,9	1,1	0,960	484
	juni	7,2	0,2	7,8	8,1	1,2	1,2	0,772	386

Tabel 36. Resultaten van algengroei-potentietoetsen uitgevoerd op oppervlaktewater, effluent en mengmonsters (mg/l)

(PvB: Put van Broeckhoven Nv : effluent rwzi te Nieuwveen
AP : Akkerdijkse Plassen THD: " " TH-Delft

10.3.2 resultaten en bespreking

Uit de chemische gegevens in bovenstaande tabel (gemeten in de monsters na autoclavieren) blijkt dat niet alleen de gehalten aan nutriënten, maar ook de verhoudingen tussen de nutriënten onderling sterk verschillen. Dit verschil in verhouding kan bij gelijke concentratie van één van de nutriënten in enkele toetswateren toch een verschil in algengroei-potentiewaarden veroorzaken, als gevolg van een gebrek aan het andere nutriënt.

Hoewel hier twee variabelen aanwezig zijn die de algengroei-potentiewaarden van een water beïnvloeden, bepaalt het gehalte van alle aangeboden nutriënten de hoogte van de algengroei-potentiewaarden.

Bij vergelijking van de stikstofgehalten in de monsters uit de Akkerdijkse Plassen in april en juni is er een verschuiving te zien in de vorm waarin het anorganisch stikstof voorkomt. Daar beide vormen goed opneembaar zijn voor de toetsalg, hoeft dit de algengroei niet te beïnvloeden. Toch is de algengroei-potentiewaarde in april veel lager dan in juni. In april zal de algengroei door andere factoren dan stikstof of fosfor bepaald zijn.

Bij het onderzoek naar de invloed van een lozing van effluent van een rwzi op een ontvangend water is het niet voldoende alleen de

algengroeiopotentiewaarde van het effluent bij de te verwachten verdunning te bepalen. Door de combinatie van effluent met het oppervlaktewater kunnen effecten versterkt of verzwakt worden, zoals bij de combinatie van water uit de Akkerdijkse Plassen en effluent van de rwzi te Nieuwveen (AP+Nv)

Niet altijd is een hogere waarde voor OD₇₅₀ terug te vinden in een hogere waarde voor het drooggewicht, zoals blijkt uit een vergelijking van deze waarden voor de monsters uit de Akkerdijkse Plassen in februari en juni. Een lineair verband tussen waarden voor OD₇₅₀ en drooggewicht zijn wel binnen één toetsserie van één monster te vinden. Tussen toetsseries onderling kunnen verschillen optreden. Waarden voor OD₇₅₀ mogen daarom niet zonder meer worden omgezet in waarden voor drooggewicht met behulp van een omrekeningsfactor verkregen uit een andere toetsserie.

10.4 Ringonderzoek

Aan het ringonderzoek is deelgenomen door de laboratoria van

- de vakgroep Waterzuivering, Landbouw Hogeschool, Wageningen
- het Hoogheemraadschap van Rijnland
- de vakgroep Gezondheidstechniek en Waterbeheersing, Technische Hogeschool Delft

Het onderzoek omvatte het uitvoeren van de algengroeiopotentietoets op oppervlaktewater en op effluent van een rwzi in verschillende verdunningen.

10.4.1 experimenteel

De volgende watersoorten waren bij het onderzoek betrokken.

- oppervlaktewater: Westeinderplas
- effluent van de rwzi te Nieuwveen in de verdunning 1:15 - 1:31 - 1:63
- controle: Z8-medium op 10% van de normale sterkte.

De mate van verdunning is bepaald aan de hand van het fosforgehalte en wel zo dat in de toets dit gehalte niet hoger was dan 0,5 mg P/l. De resultaten van dit onderzoek, uitgedrukt als drooggewicht, zijn weergegeven in tabel 37.

laboratorium watertype	Wageningen		Leiden		Delft	
	gem.	min.-max.	gem.	min.-max.	gem.	min.-max.
oppervlaktewater	128	124-131	118	100-140	77	69-94
effluent 1:15	119	108-125	94	82-104	109	106-114
1:31	69	62- 74	47	37- 70	57	56- 59
1:63	47	46- 50	16	8- 22	30	27- 37
controle	354	328-387	251	247-255	250	230-260

Tabel 37. Resultaten van het ringonderzoek met de algengroeiopotentietoets. Waarden voor het drooggewicht (mg/l)

10.4.2 resultaten en bespreking

Uit deze resultaten blijkt dat er onderling grote verschillen zijn. De verschillen zijn niet systematisch aan één laboratorium toe te schrijven, zowel Wageningen als Delft laten eenmaal sterk afwijkende waarden zien. Deze verschillen in de resultaten zijn niet veroorzaakt door mogelijke grote afwijkingen bij het bepalen van het drooggewicht. Bij een controle vooraf bleek dat de verschillen bij het bepalen van het drooggewicht ten hoogste 6% waren, onderzocht aan drie analyses in duplo.

Nadere beschouwing van alle meetgegevens van de deelnemende laboratoria laat zien dat de verkregen verzamelingen van resultaten elkaar echter overlappen.

De algengroei-potentiewaarden van het effluent binnen één verdunningsreeks vertonen wel een wetmatigheid. Vermindering in het aanbod aan nutriënten is terug te vinden in een afname van de algengroei-potentiewaarden. De serie uit Delft vertoont het meest evenwichtige beeld (regressiecoëfficiënt 0,92). De serie uit Leiden geeft een te lage waarde voor de laatste verdunning. De resultaten uit Wageningen vertonen een minder duidelijke onderlinge relatie. De regressiecoëfficiënt van 0,85, berekend uit het onderzoek naar de verdunning van de monsters voor de voorbehandeling (p.31), komt uit deze reeks niet naar voren.

Als gevolg van het werken met levende organismen is de kans op spreiding in de resultaten binnen één serie en tussen de series onderling groter dan bij fysisch-chemische analyses^{3,6}. De algencultuur is wel gedetermineerd en omschreven, maar als gevolg van de kweekomstandigheden of de behandeling kan deze in de loop der tijd in fysiologisch opzicht gaan veranderen. Fysiologische veranderingen kunnen tot uiting komen in een verandering van de maximale biomassa in relatie tot het te toetsen water of een minder effectief produceren van organisch materiaal. Bij het ringonderzoek hebben de drie laboratoria ieder hun eigen culture gebruikt. Ook andere niet voorziene omstandigheden kunnen bijgedragen hebben tot de onderlinge verschillen. De mogelijkheid bestaat dat door verschillen in de apparatuur om de kweekomstandigheden te controleren, deze niet in alle drie de laboratoria geheel gelijk waren. Door bijvoorbeeld het gebruik van verschillende typen lichtmeters, waarbij niet alleen de intensiteit maar ook de samenstelling van het licht in de meting wordt betrokken, bestaat de mogelijkheid dat de voorgeschreven hoeveelheid licht (24 W/m^2) niet overal is aangehouden.

Bij een evaluatie van de algengroei-potentietoets, ontwikkeld door de Environmental Protection Agency^{3,6}, bleken de resultaten van de acht deelnemende laboratoria onderling grote verschillen te vertonen, hoewel een aantal mogelijke foutenbronnen, zoals toetsalgen uit verschillende cultures en chemicaliën, al bij voorbaat waren uitgeschaald. Binnen één laboratorium was de spreiding in de resultaten echter gering en de reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid groot. Een mogelijke oorzaak van deze verschillen zijn waarschijnlijk systematische afwijkingen in de kweekcondities geweest.

De algengroei-potentietoets omvat een groot aantal handelingen en strekt zich uit over een periode van enkele dagen. Dit zijn factoren

die ook kunnen bijdragen tot de spreiding. Door systematische verschillen bij het uitvoeren van de noodzakelijke handelingen kunnen resultaten verkregen in een ringonderzoek onderling verschillen, hoewel de resultaten binnen één laboratorium weinig spreiding vertonen en reproduceerbaar zijn.

10.5 Eindconclusies

- Op grond van de resultaten van de voorgaande onderzoeken is een voorlopig voorschrift voor de uitvoering van algengroei-potentietoetsen opgesteld.
- Bij toetsing van het voorschrift in praktijksituaties bleek dat een vermindering van het gehalte aan nutriënten zich uitte in een vermindering van het drooggewicht. In een aantal toetsen is de procentuele vermindering van deze gehalten ook als zodanig in de algengroei-potentiewaarden terug te vinden.
- Bij uitvoering van algengroei-potentietoetsen op verschillende laboratoria met dezelfde watermonsters bleken de eindwaarden onderling niet gelijk, maar vertoonden ingezet in een verdunningsreeks wel eenzelfde tendens. Dit kan een gevolg zijn van verschillen in bijvoorbeeld de voorraadculturen, kweekomstandigheden of systematische afwijkingen in het uitvoeren van de voorgeschreven handelingen.

De algengroei-potentietoets uitgevoerd in een goed geoutilleerd laboratorium kan derhalve leiden tot een goed bruikbare, ondersteunende, uitspraak over een bepaalde situatie. Reproduceerbaarheid voor eenzelfde monster is in verschillende laboratoria voorhands niet mogelijk gebleken, mede gezien de altijd optredende onderlinge verschillen.

LITERATUUR

- 1 Anonymus-Algenontwikkeling, Hoogheemraadschap der Uitwaterende Sluizen in Kennemerland en Westfriesland, z.j.
- 2 Bolier, G., van Breemen, A.N. & Visser, G. - Eutrofiëringstoetsen: een mogelijkheid om de betekenis van een lozing van afvalwater voor de biologische kwaliteit van het ontvangende water in te schatten, *H₂O*, 14 (1981) 4: 83-92.
- 3 Bolier, G. & van Breemen, L.W.C.A. (ed.) - Standaardisatie van de algengroei-potentietoets voor Nederland: Verkenning en afbakening, Delft, rapport 82-08, Technische Hogeschool, Vakgroep Gezondheidstechniek, 1982.
- 4 Claassen, T.H.L. - Biologisch wateronderzoek 1976-1980, Leeuwarden, Provinciale Waterstaat Friesland, 1981.
- 5 Claesson, A. & Forsberg, Å. - Algal assay procedure with one or five species. Minitest, Mitt. Internat. Verein. Limnol., 21 (1978): 21-30.
- 6 Claesson, A. - Research on recovery of polluted lakes: Algal growth potential and the availability of limiting nutrients, Uppsala, Acta Universitatis Uppsaliensis 461, 1978.
- 7 Dresscher, Th.G.N. - Index van namen en vindplaatsen die betrekking hebben op in nederlandse wateren aangetroffen algen en enige groepen van microorganismen, Amsterdam, North-Holland Publ. Comp., 1976.
- 8 El'piner, J.A. - Ultrasound. Physical, chemical and biological effects, New York, Consultants bureau, 1964.
- 9 Filip, D.S. & Middlebrooks, E.J. - Evaluation of sample preparation techniques for algal bioassays, *Water Research*, 9 (1975): 581-585.
- 10 Fitzgerald, G.P. - Evaluation of the availability of sources of nitrogen and phosphorus for algae, *J. Phycol.*, 6 (1970): 239-247.
- 11 Forsberg, C. - Nitrogen as a growth factor in fresh water, *Prog. Wat. Tech.* 8 (1977) 4/5: 275-290.
- 12 Horwood, H.W., Horton, J.P. & Minck, V.A. - Factors influencing bactericidal action of ultrasonic waves, *JAWMA*, 43 (1951): 153-160.
- 13 International Organization of Standardization - Algal growth inhibition test (draft method), ISO/TC 147/SC 5/WG 5, The Hague, 1983, 9 p.
- 14 Javornicky, P. - Bioassay using a natural phytoplankton assemblage. In: *Algal assays and monitoring eutrophication*, Marvan, P., Přebil, S. & Khotský, O., Stuttgart, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1979, 119-130.
- 15 Källquist, T. - Algal assay procedure (bottle test) at the Norwegian Institute of Water Research. In: *Algal assays in water pollution research*, Proc. Nordic Symposium, Helsinki, Nordforsk publication, 1973, 2.
- 16 Klapwijk, S.P. - Limnologisch onderzoek naar effecten van defosfatering in Rijnland, *H₂O*, 14 (1981) 20: 472-479.
- 17 Klapwijk, S.P. - Hydrobiologisch onderzoek naar het waterkwaliteitssysteem van Caspers en Karbe in Zuid-Holland, Leiden, Hoogheemraadschap van Rijnland, 1982.

- 18 Komárek, J. and Marvan, P. - Selection and registration of strains of algae as assay organisms. In: Algal assays and monitoring eutrophication, Marvan, P., Přebil, S. & Lhotský, O., Stuttgart, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1979, 87-102.
- 19 Krywalska, M. & Skrzypczyk, J. - Influence of nitrate concentration on pigment content in *Chlorella pyrenoidosa*, Acta Soc. Bot. Pol. 46 (1977) 3: 489-499
- 20 Miller, W.E., Greene, J.E. & Shiroyama, T. - The *Selenastrum capricornutum* Printz algal bottle test, Corvallis, EPA-600/9-78-018, 1978.
- 21 Mitteilungen Internat. Verein. Limnol. - Experimental use of algal cultures in limnology. Proceedings Symposium Sandefjord, Norway. Stuttgart, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1978, nr.21.
- 22 Nederlands Normalisatie Instituut - Water - bepaling van de toxiciteit met behulp van algen, NEN 6506, 1984, 8 p.
- 23 Nederlands Normalisatie Instituut - Water - spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a, NEN 6520, 1981, 8 p.
- 24 Nederlands Normalisatie Instituut - Water - benodigdheden, werkwijze en medium voor het kweken van algen, NPR 6505, 1984, 4 p.
- 25 Oliver, B.G. & Cosgrove, E.G. - The disinfection of sewage plant effluent using ultraviolet light, Can. J. Chem. Eng., 53 (1975): 170-174.
- 26 Piorreck, M., Baasch, K.H. & Pohl, P. - Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes, Phytochemistry 23 (1984) 2: 207-216.
- 27 Rodhe, W. - Environmental requirements of freshwater plankton algae, Symb. bot. Uppsal. 10 (1948): 1-149.
- 28 Rodhe, W. - Algae in culture and nature, Mitt. Internat. Verein. Limnol., 21 (1978): 7-20.
- 29 Ryding, S.-O. - Monitoring inland waters, Helsinki, Nordforsk publication, 1980, 2.
- 30 Sachs, L. - Applied Statistics, New York, Springer-Verlag, 1982.
- 31 Schenck, G.O. - Möglichkeiten des Einsatzes der Ultra-Violet-Bestrahlung zur Entkeimung von Brauchwasser I, Parfumerie Kosmetik. 60 (1979) 11: 397-406.
- 32 Schenck, G.O. - Ultraviolet sterilization. In: Handbook of water purification, Lorch, W., London, McGraw-Hill, 1981, 363-426.
- 33 Skoog, D.A. & West, D.M. - Principles of instrumental analyses, Philadelphia, Saunders College, 1980.
- 34 Skulberg, O.M. - Algal problems related to the eutrophication of European water supplies, and a bioassay method to assess fertilizing influences of pollution on inland waters. In: Algae and Man, Jackson, D.F., New York, Plenum Press, 1964, 262-299.
- 35 Steenbergen, C.L.M. - Pleomorphism of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. (Chlorofyceae) in synchronized cultures, Mitt. Internat. Verein. Limnol., 21 (1978): 216-223.

- 36 Vollenweider, R.A. - Primary production in aquatic environments, I.B.P. Handbook nr.12, Oxford, Blackwell Scient. Publ., 1971.
- 37 Weber, W.J. & Stumm, W. - Mechanism of hydrogen ion buffering in natural waters, JAWWA, 55 (1963): 1553-1580.
- 38 Weiss, C.M. & Helms, R.W. - The interlaboratory precision test. An eight laboratory evaluation of the Provisional Algal Assay Procedure bottle test, Chapel Hill, University of North Carolina, 1971.

B I J L A G E N

Gebruikte analysemethoden

Fosforverbindingen.

- orthofosfaat : met behulp van antimoonmolybdaat volgens Goltermann, Clymo & Ohnstad - I.B.P. - Handbook nr.8, Oxford, Edinburgh. Blackwell Scientific Publications (1978).
totaal fosfaat : Hydrolyse volgens "Standard Methods" (1971) gevolgd door een orthofosfaatbepaling.

Stikstofverbindingen.

- nitraat : RID-voorschrift (1963) met behulp van natriumsalicylaat.
nitriet : Normvoorschrift NEN 3235 met behulp van Griess-Romijn-van Eck-reagens.
ammonium-ion : indofenolmethode volgens Schreiner, Wat. Res. 10 (1976): 31 - 36.
totaal stikstof : analyse volgens Mackereth, Heron & Talling - Water Analysis, Windemere, Freshwater Biological Association publ. 36 (1978).
Mn, Zn, Cu : EG and G polarographic analyzer/stripping voltameter model 264.
TOC/TIC : Beckmann Total Organic Carbon Analyzer model 915-B.
OD₇₅₀ : Perkin & Elmer UV/VIS spectrofotometer 551 S.
Fe, Ca : Atomaire absorptiespectrofotometrie; Perkin-Elmer A.A.S. 420
chlorofyl : NEN-6520
drooggewicht : bijlage 3c

Voorschrift voor het uitvoeren van de algengroei-potentietoets.

1 INLEIDING

De algengroei-potentie (AGP) van een water is de maximale opbrengst aan toetsalg, gekweekt in het te beoordelen water en verkregen onder goed gedefiniëerde kweekomstandigheden. De AGP wordt uitgedrukt in drooggewicht.

2 TOEPASSINGSGEBIED

De AGP-waarde kan gebruikt worden in onderzoek naar de eutrofië-ringsgraad van oppervlaktewater en al dan niet vergaand gezuiverd afvalwater.

Daar de proef in een batch-cultuur wordt uitgevoerd en alleen het water (en niet tevens de bodem) in de proef wordt betrokken, heeft deze proef slechts indicatieve waarde ten aanzien van het vaststellen van groeibeperkende factoren.

3 BEGINSSEL

Om alleen de reactie van de toetsalg te meten moeten de van nature in het water voorkomende organismen geïnactiveerd worden. Afhanke-lijk van de fosfor- en/of calciumconcentratie in het monster dient het monster verdund te worden om neerslagen tijdens de voorbehande-ling te voorkomen. De groei van de toegevoegde toetsalg wordt fre-quent gevolgd door het meten van de optische dichtheid van de cul-tuur.

Het biovolume, bereikt in de stationaire fase van de cultuur en ge-meten als drooggewicht, dient als maat voor de AGP van het water.

4 BENODIGDHEDEN

algencultuur: *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. (Chlorophyceae)
chemicaliën (p.a. kwaliteit) voor het algenmedium Z8 (gemodificeerd;
zie bijlage a)

maatkolven 100 ml, 500 ml en 1000 ml

volumepipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml

geconditioneerde kweekruimte, instelbaar op 20°C + 1°C

schudapparatuur voor erlenmeyerkolven van 500 ml, 1000 ml en 2000 ml.

lichtinstallatie, continu brandend

- spectrale samenstelling - TL-buizen nr.33

- lichtintensiteit - 24 W/m² gemeten buiten de kweekkolven op vloei-
stofniveau

lichtmeter

stoof o.a. voor het steriliseren van glaswerk (175°C)

erlenmeyerkolven 500 ml, 1000 ml en 2000 ml

bekerglazen 250 ml } nodig voor de speciale afsluiting van de
kunststofringen } kolven (zie bijlage b)

maatcilinders 100 ml, 250 ml, 500 ml

maatpipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml en 10 ml

autoclaaf (1,1 kg/cm²)
watten
aluminiumfolie
stofvrije plaats om algen te enten
microscopie vergroting 200 - 400 x
telkamer
balans
spectrofotometer

5 ANALYSES

Bepaling - OD₇₃₀
- drooggewicht (zie bijlage c, of NEN-3235)

6 WERKWIJZE

6.1 De voorbehandeling van het te gebruiken glaswerk en kweekmedium

De toets wordt uitgevoerd onder steriele omstandigheden. Al het te gebruiken glaswerk wordt gesteriliseerd (1 h bij 175°C, excl. opwarmtijd).

Het kweekmedium wordt gesteriliseerd door autoclavieren (20 min bij 121°C en 1,1 kg/cm²).

Glaswerk wordt na gebruik volgens voorschrift gewassen om verontreiniging van de glaswand te voorkomen (zie bijlage d).

6.2 De voorbehandeling van het te toetsen water

Afhankelijk van de fosfor- en/of calciumconcentratie wordt het water verdund met gedestilleerd water. De verdunningsreeks wordt logaritmisch opgezet en wel zodanig dat de fosforconcentratie niet lager is dan 0,02 mg P/l. Het werken met een reeks met 3 of 4 verdunningen verdient de voorkeur.

Om de aanwezige organismen te inactiveren worden de watermonsters in de kweekkolven geautoclaveerd (20 min bij 121°C en 1,1 kg/cm²), afgedicht door een wattenprop en aluminiumfolie.

6.3 Het inzetten van de toets

De keuze van het volume van de erlenmeyerkolven is afhankelijk van de parameters die gemeten zullen worden (aantal en frequentie). In verband met een voldoende CO₂-voorziening kunnen de kolven slechts voor 20% van hun volume worden gevuld. Iedere verdunning wordt in viervoud ingezet.

Als controle op de kweekomstandigheden en het normale verloop van de groei worden cultures ingezet met medium Z8 op 10% van de voorgeschreven sterkte (in viervoud).

6.4 De bereiding en toevoeging van de ent

Scenedesmus quadricauda wordt voorgekweekt op medium Z8, op 10% van de voorgeschreven sterkte, waarbij het gehalte aan fosfor zodanig wordt gekozen dat dit lager is dan, of gelijk is aan de in het te toetsen water verwachte concentraties.

Uit de voorcultuur wordt in de exponentiële groeifase (4 tot 5 dagen oud) de ent betrokken. De concentratie van de algen wordt door

middel van tellen met behulp van de microscoop bepaald. Geteld worden de cellen, niet de coenobia. Op grond van deze concentratie wordt het te enten volume algensuspensie bepaald. De ent moet een zodanig volume hebben dat de concentratie aan algen in de kweekkolven 2×10^7 cellen/l is.

6.5 Het kweken

De kweekomstandigheden waaronder de toets wordt uitgevoerd, zijn:

- temperatuur $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- continue belichting, 24 W/m^2 met TL-33 lampen
- continue menging
- afsluiting van de erlenmeyerkolven door omgekeerde bekerglazen.

6.6 Het meten

Als parameter voor de groei wordt, indien mogelijk dagelijks de optische dichtheid (λ : 750 nm) van de cultures gemeten. Bij hoge waarden voor de optische dichtheid als een lineaire relatie tussen de optische dichtheid en de algencentratie niet meer gewaarborgd kan worden, moet het monster voor de meting verdund worden. De proef wordt beëindigd als de toename van de optische dichtheid bij twee opeenvolgende dagelijkse metingen $\leq 5\%$ is.

Bij het beëindigen van de proef wordt de biomassa bepaald door middel van het bepalen van het drooggewicht (zie bijlage c).

6.7 Verwerking van de resultaten

De resultaten van de vier kolven binnen één serie worden gemiddeld. Dit is de AGP-waarde van de serie.

Als er een verdunningsreeks is ingezet, kan met behulp van de verkregen resultaten de AGP-waarde van het onverdunde monster worden berekend.

6.8 Controle op de kweekomstandigheden

Om te controleren of de groei van de algen in de proef bepaald is door de nutriëntenconcentratie en niet door de proefomstandigheden, bepaalt men na het beëindigen van de proef het gehalte aan stikstof- en fosforcomponenten in het getoetste water.

6.9 Controle van de algencultuur

Om na te gaan of de voorraadcultuur van *Scenedesmus quadricauda* in de loop der tijd geen fysiologische of morfologische veranderingen heeft ondergaan wordt er iedere 6 maanden een groeicurve van de cultuur op het medium Z8, op 10% van de voorgeschreven sterkte bepaald en wordt de morfologie regelmatig door middel van een microscopisch onderzoek gecontroleerd.

Z8 medium (gemodificeerd)

Oplossen in 1000 ml gedestilleerd water (Z8 100%)

		elementen	mg/l
NaNO ₃	467 mg	N	84,0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	59 mg	P	5,42
* KH ₂ PO ₄	24,2 mg	Ca	9,9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25 mg	Mg	2,48
NaHCO ₃	84 mg	Na	149
* Fe-EDTA	10 ml	K	6,9
sporenmengsel	10 ml	C	2,4
		S	3,3

* Deze oplossingen apart autoclaveren en daarna aan het geautocla-
veerde medium toevoegen.

N.B. KH₂PO₄ voor het afwegen drogen in droogstoof (1 h bij 105°C)

Bij het maken van het medium de maatkolf eerst vullen met circa
500 ml gedestilleerd water, dan de chemicaliën toevoegen en aanvullen
tot 1000 ml. Dit om neerslagen te voorkomen.

Fe-EDTA-oplossing.

oplossing I : FeCl₃·6H₂O 2420 mg oplossen in 100 ml 0,1 N HCl
II: Na₂EDTA 3723 mg oplossen in 100 ml gedestilleerd
water

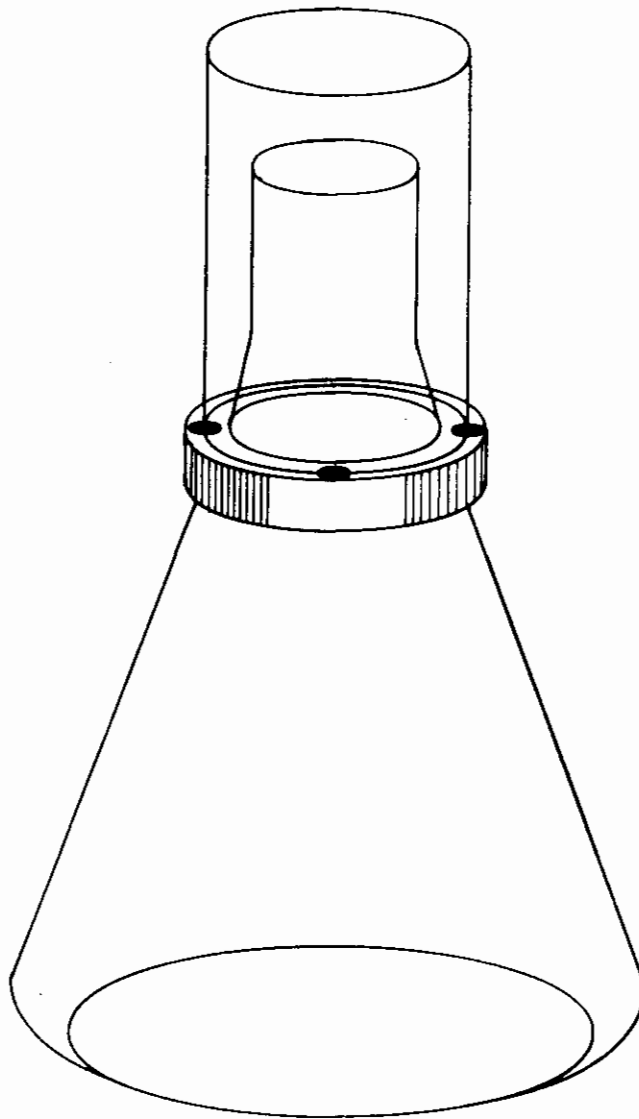
5 ml opl. I en 5 ml opl. II bij elkaar voegen en aanvullen tot
500 ml met gedestilleerd water.

Sporenmengsel

oplossen in 1000 ml gedestilleerd water.

		elementen	µg/l
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,9 mg	Fe	500
KBr	1,2 mg	C	380
KJ	0,8 mg	Mo	4,9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,9 mg	Br	8
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,3 mg	J	6,1
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	2,0 mg	Zn	6,6
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	4,7 mg	Cu	3,3
Cr(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,4 mg	Cr	0,67
H ₃ BO ₃	31 mg	Al	2,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	22,3 mg	B	54
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg	Mn	72,4
		Ni	2,9
		Co	3,0

Afsluiting van de kweekkolf met behulp van een omgekeerd bekerglas en kunststofring.



Bepaling van het drooggewicht van algen.

1 PRINCIPE

Een bekend volume algensuspensie wordt gefiltreerd over een gedroogd en gewogen filter. Na droging wordt uit het gewicht van de gefiltreerde algen en het filtraatvolume het drooggewicht van de algensuspensie per volumeëenheid berekend.

2 BENODIGDHEDEN

- volumepipetten/maatcilinders
- filtreeropstelling (zie NEN 6520, Bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a)
- glasvezelfilters
- gedestilleerd water
- pincet
- stoof (105°C)
- exsiccator
- balans

3 WERKWIJZE

3.1 Voorbehandeling van de filters

Glasvezelfilters worden in een filtreeropstelling geplaatst en 3x gespoeld met 20 ml gedestilleerd water. Hierna worden ze in de stoof gedroogd tot constant gewicht (circa 1 uur bij 105°C). Na afkoeling in de exsiccator tot kamertemperatuur (circa 15 min.) wordt het filter gewogen (F_0).

3.2 Volume monster

Afhankelijk van de dichtheid van de cultures wordt een bepaald volume algensuspensies gefiltreerd. Het volume moet zodanig zijn dat de gewichtstoename van het filter, na drogen, $\geq 2,5$ mg is. Dit om te voorkomen dat de gewichtstoename binnen de meetfout van de balans valt.

3.3 Metten

Het volume van de algensuspensie wordt bepaald met behulp van een volumepipet of maatcilinder, afhankelijk van de grootte van het volume. De volumepipet of maatcilinder en de filtreeropzet worden 3x nagespoeld met voldoende gedestilleerd water. De filters worden in de stoof gedroogd (105°C) tot constant gewicht. Vóór het wegen worden ze gedurende circa 15 min. in de exsiccator afgekoeld tot kamertemperatuur. Gewicht van de filters met algen: F_a

4 BEREKENING

$$\text{d.w (mg/l)} = \frac{F_a - F_0}{V_m} \times 1000$$

F_a : gewicht filter met algen (mg)
 F_0 : gewicht filter (mg)
 V_m : volume monster (ml)

Het wassen van het glaswerk

Al het glaswerk te gebruiken in de algengroei-potentietoets wordt als volgt gewassen:

- spoelen met een warme soda-oplossing
- 5x spoelen met kraanwater
- spoelen met een HCl-oplossing 1 N
 bij gebruik van wasmachines kan het nodig zijn een ander
 zuur, b.v. azijnzuur te gebruiken
- 5x spoelen met kraanwater
- 5x spoelen met demiwater
- drogen