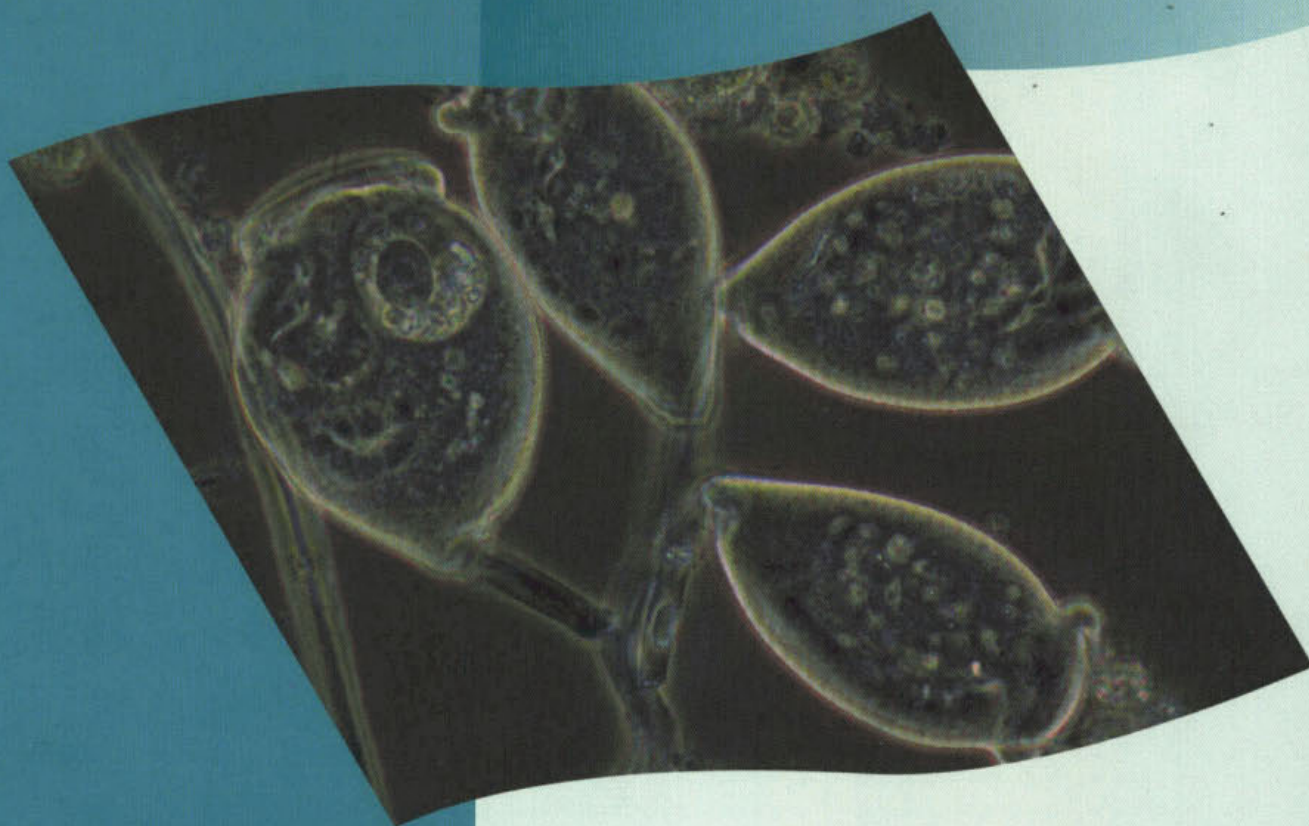


1999-01_procesbewaking-microscopisch-slibonderzoek

stowa

Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer

Handleiding procesbewaking door microscopisch slibonderzoek



99

01

Handleiding procesbewaking door microscopisch slibonderzoek

99 01

Arthur van Schendelstraat 816
Postbus 8090, 3503 RB Utrecht
Telefoon 030 232 11 99
Fax 030 232 17 66

Publicaties en het publicatie-
overzicht van de STOWA kunt u
uitsluitend bestellen bij:
Hageman Verpakkers BV
Postbus 281
2700 AC Zoetermeer
tel. 079 - 361 11 88
fax 079 - 361 39 27
o.v.v. ISBN- of bestelnummer en
een duidelijk afleveradres.
ISBN 90.5773.052.9

Inhoud

Inhoud	1
Ten Geleide	5
1 Inleiding	7
2 Microscopie	9
2.1 Grondbeginselen	9
2.2 Helderveld en Fase-contrast	11
2.3 Het maken van een preparaat	11
2.4 Instellen en gebruiken van een microscoop	12
2.5 Meten en tellen	13
2.6 Kleuringstechnieken	14
2.6.1 Kleuring volgens Gram	14
2.6.2 Neisser kleuring	16
2.7 Zwavelopslagtest	22
2.8 Overige technieken	22
3 Microscopisch onderzoek van actiefslib	23
3.1 Monsternamen en -behandeling	23
3.2 Werkwijze bij het uitvoeren van de analyse	23
3.3 Het microscopisch beeld	24
3.4 Keuze van het juiste objectief	25
3.5 Registratie van de waarnemingen	26
4 Kenmerken van actief-slibvlokken	29
4.1 Morfologische kenmerken	29
4.2 Samenstelling van de vlok	34
4.3 Losse cellen, spirocheten en spirillen	38
4.4 Vloktypen	39
5 Draadvormende micro-organismen	43
5.1 De Filament-Index	43
5.2 Determineren van draadvormende micro-organismen	47
5.2.1 Determinatiekenmerken	48
5.2.2 De begrippen 'dominerend' en 'secundair'	53
5.2.3 Werkwijze bij het determineren	53
5.3 Beschrijving van de diverse soorten	58
5.3.1 Actinomyceten	58
5.3.2 <i>Beggiatoa</i>	59
5.3.3 'Cyanophyceae'	59
5.3.4 <i>Flexibacter</i>	60
5.3.5 <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	62
5.3.6 <i>Leucothrix</i>	63

5.3.7 <i>Microthrix parvicella</i>	63
5.3.8 <i>Nostocoida limicola</i> I.....	66
5.3.9 <i>Nostocoida limicola</i> III	66
5.3.10 Schimmels.....	67
5.3.11 <i>Sphaerotilus natans</i>	68
5.3.12 "Streptococcus"	68
5.3.13 <i>Thiothrix</i>	69
5.3.14 Type 0041/0675.....	71
5.3.15 Type 0092.....	72
5.3.16 Type 0211.....	73
5.3.17 Type 021N.....	73
5.3.18 Type 0411.....	76
5.3.19 Type 0581.....	76
5.3.20 Type 0803.....	77
5.3.21 Type 0914.....	77
5.3.22 Type 0961.....	78
5.3.23 Type 1701.....	80
5.3.24 Type 1702.....	81
5.3.25 Type 1851.....	81
5.3.26 Type 1852.....	83
5.3.27 Type 1863.....	83
6 Protozoën en metazoën.....	87
6.1 Protozoën	88
6.1.1 Ciliaten.....	88
6.1.2 Flagellaten.....	97
6.1.3 Amoeben, schaalamoeben en zonnediertjes	100
6.2 Metazoën.....	102
6.2.1 Rotiferen	102
6.2.2 Nematoden	103
6.2.3 Beertjes	103
6.2.4 Wormen.....	104
6.3 Indikatorfunctie.....	104
7 Conclusies slibonderzoek	107
8 Het actief-slibproces.....	109
8.1 Basis: toepassen en versnellen van natuurlijke kringloopprocessen	109
8.2 Vorming van actief-slibvlokken	110
8.3 Factoren die de samenstelling van actief-slibvlokken bepalen.....	111
8.3.1 Slibbelasting en -leeftijd.....	112
8.3.2 Samenstelling van het afvalwater	113
8.3.3 Zuurstof.....	115
8.3.4 Configuratie	116
8.3.5 Temperatuur en pH.....	119
8.4 Opname van voedingsstoffen door de vlok	120

9 Operationele problemen.....	123
9.1 Hoge slibbelasting en/of zuurstofgebrek	124
9.2 Vergiftiging van het slib	126
9.3 Veel kleine vlokken; deflocculatie	126
9.4 Zwaar slib.....	127
9.5 De nabezinktank functioneert niet optimaal	127
9.6 Zuiveringsprestaties niet toereikend; effluent echter helder	128
9.7 Afname van de slibproductie	128
10 Licht slib	131
10.1 Filament-index en Slibvolume-index	132
10.2 Groei van draadvormende micro-organismen.....	134
10.3 Procesomstandigheden en populatiesamenstelling	135
10.3.1 Slibbelasting > 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag en communaal influent	135
10.3.2 Karakteristiek voor lage slibbelastingen.....	136
10.3.3 Effect van biologische nutriëntenverwijdering	139
10.3.4 Competitie tussen draadvormende organismen.....	140
10.4 Bestrijden van licht slib	140
10.4.1 Selectie van vlokvormers door het toepassen van een hoge vlokbelading.....	142
10.4.2 Dimensionering van een aërobe selector*	144
10.4.3 Combinatie met nutriëntenverwijdering	145
10.5 Zoogloea licht slib.....	147
11 Flotatie van slib	149
11.1 Drijfslagvorming waarbij draadvormers geen doorslaggevende rol spelen.....	149
11.2 Gestabiliseerde gasbelletjes	151
11.3 Effect van de populatiegrootte en -samenstelling op de vorming van drijfslagen.....	152
11.4 Bestrijden van drijfslagen.....	156
12 Slotopmerkingen.....	159
13 Literatuur	161
 Bijlage A Structuur CD	
 Bijlage B Formulier voor het noteren van de kenmerken van draadvormende micro-organismen in actiefslib	
 Bijlage C Analyseformulier	

Ten Geleide

Microscopisch slibonderzoek wordt toegepast bij het controleren en optimaliseren van het actiefslibproces. Die vorm van procesbewaking zal, gezien de gestelde effluenteisen, alleen maar noodzakelijker worden bij het beheer van rwzi's.

De handleiding die daarvoor bestond werd door de STOWA in 1979 uitgebracht en was duidelijk aan vervanging toe. In de periode 1996-1998 is de onderhavige handleiding "Procesbewaking door microscopisch slibonderzoek" tot stand gekomen, evenals de CD-i "Procesbeheer van actiefslibinstallaties via microscopisch slibonderzoek", die met deze handleiding is gecombineerd. Beide tonen op systematische wijze:

- de grondbeginselen van het actief-slibproces
- de invloed van de procesomstandigheden op de slibkwaliteit
- trouble shooting en oplossingen voor operationele problemen (licht slib)
- een volledige cursusprogramma microscopisch slibonderzoek
- een uitvoerige encyclopedie
- een demo voor bezoekers van de rwzi

De CD-i, die een voortreffelijke beeldkwaliteit bezit, ook in de bijna 100 video-filmpjes, is ontwikkeld als expertsysteem en trainingsinstrument voor technologen, bedrijfsvoerders en microscopisten. Voor het afspelen van de CD-i volstaat een CD-i speler + een TV/monitor.

Het project werd uitgevoerd door TNO Milieu, Energie en Procesinnovatie (projectteam bestaande uit ir. D.H. Eikelboom en ing. A. Draaijer), de productie van de CD-i werd verzorgd door de firma Ars media. Het project werd namens de STOWA begeleid door een commissie bestaande uit ir. S. Gaastra (voorzitter), ing. H.A.P. Mollen, ir. J.H. Rensink, ir. P.C. Stamperius, ing. D. de Vente en ir. L.J.T. de Vreede.

Deze multimedia producten zijn in een samenwerkingsverband tussen de STOWA en TNO-MEP gerealiseerd. Op die basis is overeengekomen dat niet-STOWA-leden zich voor Handleiding en CD-i wenden tot TNO-MEP in Apeldoorn.

Utrecht, maart 1999

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

1 Inleiding

Voor de zuivering van afvalwater wordt op grote schaal gebruik gemaakt van het actief-slibproces. Hoewel dit proces in diverse modificaties toepassing vindt, zijn de basisprincipes van al deze uitvoeringsvormen met elkaar vergelijkbaar. De biologie vormt de as waar het proces om draait. Storingen zijn vaak een rechtstreeks gevolg van een verkeerde samenstelling van de biomassa. Informatie over deze samenstelling is daarom onontbeerlijk om storingen in het zuiveringsproces op de juiste manier te interpreteren en zodoende gericht te kunnen oplossen. Zo kan bijvoorbeeld een troebel effluent niet alleen veroorzaakt worden door het slecht bezinken van de vlokken in de nabezinktank, als gevolg van een massale groei van draadvormende micro-organismen, maar ook door te kleine vlokken, de afwezigheid van een goed protozoënbestand of door disperse bacteriegroei. Hoewel het uiteindelijke effect van al deze storingen dus met elkaar vergelijkbaar is, is toch steeds sprake van verschillende oorzaken. Het is vanzelfsprekend dat bij de uiteindelijke keuze van het soort maatregel om bepaalde storingen in het zuiveringsproces op te heffen rekening gehouden moet worden met wat er in feite aan de hand is. Een microscopische beoordeling van het slib is hierbij onmisbaar, aangezien alleen op deze manier informatie over de feitelijke kwaliteit van de slibvlok verkregen kan worden.

Rond 1975 is een methode ontwikkeld waarmee een aantal belangrijke kwaliteitskenmerken van de biomassa via microscopisch onderzoek op een eenvoudige en snelle manier vastgesteld kan worden. Deze analysemethode is in 1979 vastgelegd in de "Handleiding voor microscopisch slibonderzoek" en wordt nu wereldwijd toegepast.

Sinds 1979 is de kennis over dit onderwerp sterk verdiept en uitgebreid. Er is nu met name veel meer informatie beschikbaar over (1) de invloed van de procesomstandigheden op de slibkwaliteit en (2) de vertaling van het microscopisch beeld naar procestechnologische maatregelen. Daarnaast zijn de eisen die aan het effluent gesteld worden fors aangescherpt, waardoor processtabiliteit belangrijker is dan ooit. Om deze redenen is besloten een volledig geactualiseerde versie van de intussen 20 jaar oude handleiding samen te stellen.

Naast de handleiding is over dit onderwerp ook een CD gemaakt. De beide onderdelen van het multimedia pakket vullen elkaar aan. Op de CD zijn de visuele aspecten nader uitgewerkt via talrijke animaties, foto's en video's. Ook wordt het 'levende karakter' van de slibpopulatie uitgebreid gedemonstreerd. Door de interactieve structuur (zie Bijlage A) zijn de onderwerpen snel toegankelijk. Bij de handleiding ligt het zwaartepunt op de verdere uitleg en de theorie. Deze combinatie vormt een uniek instrument voor procesbeheer, opleiding en training.

De handleiding omvat twee hoofdonderwerpen: Microscopisch slibonderzoek (hoofdstukken 2 t/m 7) en Procesbeheer (vanaf hoofdstuk 8). In het eerste gedeelte wordt uitgelegd hoe de diverse kenmerken van actiefslib via microscopisch onderzoek vastgesteld kunnen worden. Dit gedeelte is dus vooral bedoeld voor de mi-

croscopisten. In het tweede gedeelte wordt nader ingegaan op de aard van het actief-slib en op de factoren die de samenstelling van de slibvlok bepalen. Procesbeheer en trouble shooting zijn de trefwoorden waarmee dit gedeelte kan worden samengevat.

De handleiding geeft geen compleet overzicht van alles wat over de biologie van het actief-slibproces bekend is, maar omvat wel alle informatie die nodig is om het microscopisch beeld te interpreteren en naar de praktijk te vertalen. Er is rekening mee gehouden dat de gebruikers van deze handleiding veelal een chemische en/of technologische scholing hebben gehad en daarom weinig weten over de biologie van het actief-slibproces.

In hoofdstuk 13 worden referenties gegeven als entree voor een verdergaande studie van de onderwerpen uit deze handleiding.

2 Microscopie

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

2.1 Grondbeginselen

De maximale vergroting die met een microscoop bereikt kan worden, is afhankelijk van het zogenaamd "oplossend vermogen". Hieronder wordt verstaan: het vermogen om twee naast elkaar gelegen punten nog van elkaar te kunnen onderscheiden. Anders geformuleerd: de kleinste diameter die nog scherp waargenomen kan worden.

Het oplossend vermogen van een microscoop wordt bepaald door de golflengte van de toegepaste straling (b.v. licht) en de zogenaamde numerieke apertuur (NA) van het objectief. Voor dit verband geldt de volgende formule:

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

In de numerieke apertuur zijn o.a. de brekingsindex van het glas van de lenzen en de dikte van de laag tussen het te bestuderen object en de objectief-lens verwerkt. De golflengte van zichtbaar licht ligt tussen 0,4 en 0,7 μm . Een golflengte van 0,5 μm en een NA = 1,25 (maximaal realiseerbare waarde) leidt tot een oplossend vermogen van 0,2 μm .

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

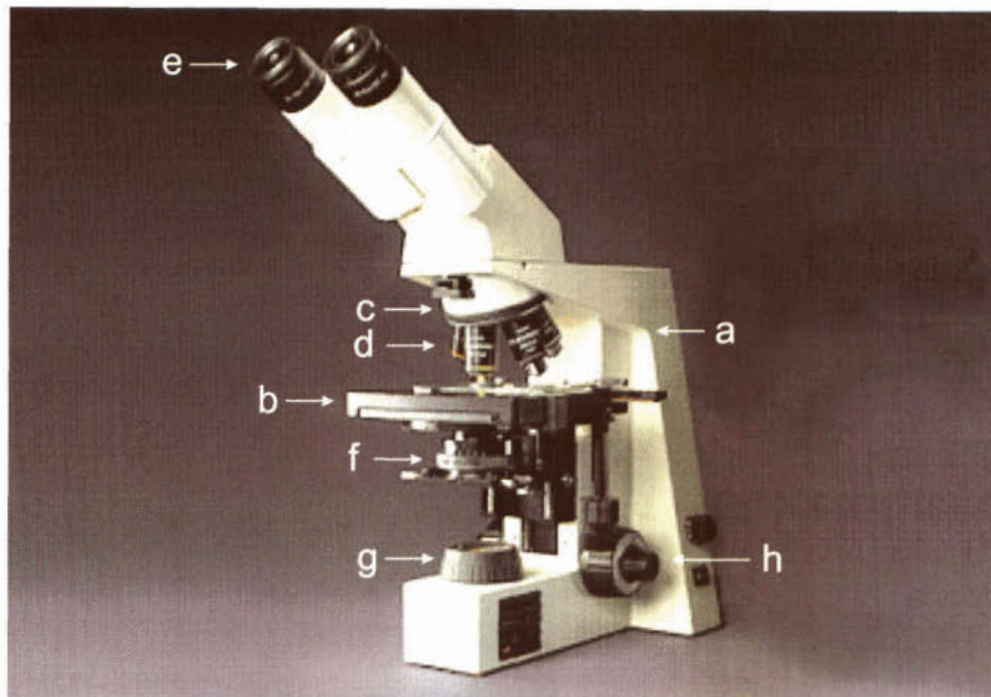
In een elektronenmicroscoop wordt niet gewerkt met zichtbaar licht maar met elektronenstraling. Aangezien de golflengte van deze straling veel kleiner is dan van zichtbaar licht is het oplossend vermogen van een elektronenmicroscoop ook veel groter. Deze bedraagt circa 0,001 μm . In deze handleiding wordt dit type microscoop echter verder buiten beschouwing gelaten; voor procesbewaking kan met een relatief eenvoudige lichtmicroscoop worden volstaan.

Zo'n lichtmicroscoop bestaat uit de volgende onderdelen (figuur 1):

- een statief;
- een kruistafel, waarop het preparaat ligt. Met de stelschroeven kan het preparaat verschoven worden;
- een revolver met drie of vier objectieven;
- twee oculairen;
- een condensor. Deze bundelt de stralen van de lichtbron en concentreert ze precies in het preparaat. De hoogte van de condensor kan met een knop versteld worden, met stelschroeven kan de lichtbundel worden gecentreerd;

- een diafragma dat gebruikt wordt om de microscoop goed in te stellen;
- een lichtbron. Deze is meestal in de voet van het statief geplaatst;
- een grof- en een fijninstelling om het objectief op de juiste afstand van het preparaat te brengen.

Het vergroten van het te bestuderen object wordt uitgevoerd met een tweetal lens-systemen, n.l. een objectief en een oculair. De eindvergroting is gelijk aan het product van de vergroting van iedere lens afzonderlijk. Meestal wordt een 10 x oculair gebruikt, soms echter ook oculairen met een vergroting van 6, 15 of 20 x. Laboratoriummicroscopen zijn uitgerust met 3-4 objectieven. Hoewel ook andere objectieven in de handel zijn, wordt meestal gewerkt met objectieven die het beeld 10, 40, of 100 maal vergroten. Dit resulteert dus in een totale vergroting (bij gebruik van een 10 x oculair) van 100, 400, of 1000 x. De keuze van het objectief is afhankelijk van de grootte van het te bestuderen object. Hierop wordt in paragraaf 3.4 teruggekomen.



Figuur 1 Schematische voorstelling van een microscoop.

<i>a: statief</i>	<i>e: oculairen</i>
<i>b: kruistafel</i>	<i>f: condensor</i>
<i>c: revolver</i>	<i>g: lichtbron + diafragma</i>
<i>d: objectieven</i>	<i>h: grof-/fijninstelling</i>

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

2.2 Helderveld en Fase-contrast

Wanneer licht een medium passeert dat niet uniform van samenstelling is, b.v. een waterdruppeltje met slibvlokjes, zal een gedeelte van de doorvallende lichtstralen meer afgebogen of verstrooid worden dan het resterende deel. Dit is een rechtstreeks gevolg van verschillen in brekingsindices (van de waterfase en de aanwezige deeltjes of onderdelen hiervan). Kleine verschillen kunnen met behulp van een zogenaamde helderveld-microscoop echter nauwelijks waargenomen worden. Dit heeft als consequentie dat helderveld minder geschikt is om contrastarme preparaten zoals actiefslib te bekijken. Deze optiek (hiermee wordt bedoeld: objectief + bijpassende condensor) wordt daarom alleen gebruikt om micro-organismen te bestuderen die contrastrijk zijn; b.v. organismen met een erg duidelijke structuur, een karakteristieke kleur, gekleurde preparaten etc. Voor het bekijken van de organismen in actiefslib is een zogenaamde fase-contrastuitrusting nodig. De fase-contrastoptiek "vertaalt" betrekkelijk kleine verschillen in brekingsindices in duidelijk waarneembare verschillen in helderheid. Hierdoor is deze uitrusting bij uitstek geschikt om betrekkelijk contrastarme organismen als bacteriën te bekijken. Ook de structuur in de cellen van micro-organismen kan met behulp van fasecontrast veel duidelijker waargenomen worden.

2.3 Het maken van een preparaat

Voor het bekijken van levend actiefslib wordt een waterpreparaat gebruikt. Bij het maken van gekleurde preparaten (zie par. 2.6) wordt met een droogpreparaat gestart.

Waterpreparaat

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

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

een waterdruppeltje van de juiste grootte kan het beste gerealiseerd worden m.b.v. een pipet met een kleine uitstroomopening (b.v. een pasteurpipet) of met een zogenaamde öse (diameter opening circa 3 mm). Eventueel teveel opgebrachte vloeistof kan d.m.v. het plaatsen van een filtreerpapiertje tegen de randen van het dekglas worden verwijderd.

Zo'n preparaat kan ongeveer 30 minuten worden gebruikt, voordat het begint uit te drogen. Dit laatste kan worden verhinderd door met een penseeltje vloeibaar gemaakte (verwarmen) vaseline langs de randen van het dekglasje te smeren. Het preparaat is nu dichtgeseald en kan uren worden gebruikt.

De waterlaag tussen dek- en voorwerpglasje moet overal even dik zijn. De aanwezigheid van wat grotere deeltjes (b.v. zandkorrels) verhindert dit soms. Het dekglasje blijft hier als het ware op rusten. Het is dan niet mogelijk om de ruimte tussen de beide glasjes helemaal op te vullen met water; aan een bepaalde kant blijft lucht aanwezig. In zo'n geval kan men beter een nieuw preparaat maken.

Droogpreparaat

Een klein druppeltje slib suspensie wordt op een voorwerpglasje gebracht en uitgestreken over een oppervlak van circa 1 cm². Het preparaat wordt vervolgens aan de lucht gedroogd. Fixeren, door het glasje even met de onderkant door de spaarvlam van een bunsenbrander te halen, is bij actiefslib niet nodig. Hierna kan de uiteindelijke behandeling, b.v. een kleuring, uitgevoerd worden.

2.4 Instellen en gebruiken van een microscoop

Het preparaat wordt op de kruistafel gelegd. Afhankelijk van de grootte van het object dat men wil bekijken, wordt een objectief gekozen en de condensorstand die daarmee correspondeert. De oogafstand tussen de beide oculairen wordt gecontroleerd. Het kijken met beide ogen vereist overigens wel enige oefening. Vervolgens wordt de afstand tussen het preparaat en het objectief met de grofinstelling verkleind tot het object vaag in beeld komt. Het scherpstellen gebeurt met de fijninstelling. Het beeld kan nu verdraaid worden met de knoppen aan de kruistafel.

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

- De condensor dient om het licht in het preparaat te concentreren. Een verkeerde hoogte-instelling leidt tot minder licht in het preparaat en een minder scherp beeld. Er moet daarom regelmatig gecontroleerd worden of de condensor op de juiste hoogte staat. In feite is deze handeling erg eenvoudig. Na het bijna sluiten van het diafragma wordt die condensorinstelling gezocht waarbij de diameter van de verlichte cirkel, zoals die in de microscoop wordt waargenomen,

minimaal is. Aansluitend wordt de verlichte cirkel met de stelschroeven gecentreerd.

- Ook voor de fase-instelling geldt dat deze regelmatig gecontroleerd moet worden. Niet alleen moet met behulp van het zogenaamde insteloculair zo nu en dan nagegaan worden of de fase-ringen nog wel concentrisch ten opzichte van elkaar staan, maar ook moet erop gelet worden of de stand van de condensor en het gebruikte objectief wel met elkaar corresponderen.
- Bij sommige microscopen is de lichtbron niet in de voet van het statief ingebouwd, maar wordt gewerkt met een los van de microscoop opgestelde lamp. Voor een optimale beeldkwaliteit is het noodzakelijk dat het licht op de spiegel in de voet van de microscoop geconcentreerd wordt. Er moet dus regelmatig gecontroleerd worden of de microscoop en de lamp niet ten opzichte van elkaar zijn verschoven.
- Objectieven en oculairen moeten regelmatig schoongemaakt worden, in elk geval na toepassing van immersie-olie. Het gebruik van lenspapier verdient de voorkeur boven papieren zakdoekjes e.d., aangezien deze producten vaak pluïsjes achterlaten. Daarnaast is het nodig om een microscoop éénmaal per jaar een algemene servicebeurt te laten geven.
- In het druppeltje immersie-olie (100 x objectieven) op het dekglasje mogen geen luchtbelletjes aanwezig zijn. Zo'n luchtbelletje heeft een andere brekingsindex dan de olie en verstoot zo de stralengang en daardoor de helderheid en de scherpte van het microscopisch beeld.
- Het vinden van het microscopisch beeld levert soms problemen op, vooral bij toepassing van 100 x objectieven. De ruimte tussen de onderkant van het objectief en het oppervlak van het dekglas (de zogenaamde werkafstand) is dan erg klein. Bij een 100 x objectief bedraagt deze circa 0,15 mm. Het risico is reëel dat bij het zoeken van het beeld het objectief iets te ver omlaag gedraaid wordt. Het objectief raakt dan de bovenkant van het preparaat en kan daardoor beschadigd worden. Dit kan worden voorkomen door in eerste instantie niet door de microscoop te kijken, bij het naar elkaar toe draaien van preparaat en objectief, maar in plaats hiervan deze beiden op het oog zo dicht mogelijk bij elkaar te brengen. Daarna pas in het oculair kijken en, door het preparaat te verdraaien, een herkenbaar punt (b.v. een slibvlok) opzoeken, waarna met de fijninstelling dit beeld in focus gebracht kan worden.

2.5 Meten en tellen

Om de grootte van deeltjes in een microscopisch preparaat te kunnen vaststellen, moet in één van de oculairen een schaalverdeling aanwezig zijn. Zo'n meetoculair moet eerst geijkt worden met een eenvoudig preparaatje waarop 1 mm in 100 eenheden is verdeeld. Hierbij wordt vastgesteld hoe groot de afstand tussen de 'streepjes' is bij de verschillende vergrotingen.

Voor het vaststellen van het aantal deeltjes (b.v. losse cellen, karakteristieke kolonies of bepaalde draadvormers) kan bij het meer routinematig onderzoek van actiefslib worden volstaan met een globale schatting. Hierbij wordt het microscopisch beeld vergeleken met een aantal referentiefoto's. Eventueel kan het aantal deeltjes ook meer exact bepaald worden met behulp van een telkamertje. Dit is in feite een waterpreparaat, waarvan het vloeistofvolume bekend is.

Meer geavanceerde kwantificeringsmethoden zijn veelal gebaseerd op het fotografisch of digitaal registreren van kenmerken, gevolgd door beeldbewerking. Dit zijn zeer nuttige methoden voor onderzoeksdoeleinden, maar voor 'dagelijks' gebruik zijn deze werkwijzen nog te arbeidsintensief. In hoeverre het microscopisch onderzoek in de toekomst geautomatiseerd kan worden, is nu nog volstrekt onduidelijk. Actiefslib is zeer heterogeen van samenstelling en bij het microscopisch onderzoek wordt een groot aantal verschillende kenmerken simultaan beoordeeld, waardoor automatisering in elk geval niet binnen de komende 10 jaar verwacht mag worden.

2.6 Kleuringstechnieken

Het is mogelijk om diverse onderdelen van de cel door middel van specifieke kleuringen beter zichtbaar te maken. In deze handleiding zullen alleen de Gram- en Neisser-kleuring aan de orde komen. Het principe van vrijwel alle kleuringen bestaat hieruit dat een bepaald onderdeel van de cel een kleurstof steviger bindt dan de andere delen van de cel.

2.6.1 Kleuring volgens Gram

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

Benodigde oplossingen

- | | |
|-----------------------------------|--|
| A. Carbolgentiaanviolet-oplossing | Verdun 10 ml van de voorraadoplossing met 90 ml van een 5% phenol-oplossing. |
| Voorraadoplossing | Carbolgentiaanviolet 10 g; alcohol (96%) 90 ml. |

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

Procedure voor de kleuring

- Maak een droogpreparaat (zie paragraaf 2.3).
- Oplossing A opbrengen, contacttijd 60 sec.; vervolgens de kleurstof van het glaasje af laten lopen.
- Oplossing B opbrengen, contacttijd 60 sec.; vervolgens de kleurstof van het glaasje af laten lopen.
- Dompel het preparaat gedurende 30 sec. onder in oplossing C. Het glaasje gedurende deze procedure rustig heen en weer bewegen.
- Preparaat schoonspoelen met leidingwater door de waterstraal zachtjes over de achterkant van het glaasje te laten stromen.
- Oplossing D opbrengen, contacttijd 120 sec.; vervolgens het preparaat weer wassen met leidingwater.
- Preparaat laten drogen en bestuderen met een 100 x helderveld objectief. Een blauwfilter versterkt het contrast. Het drogen kan worden versneld door het meeste water eerst voorzichtig met filtreerpapier (niet schuiven!) te verwijderen.

Resultaten

Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën kleuren lichtrood, respectievelijk donkerblauw (figuren 2 en 3). De blauwe kleur kan variëren van lichtblauw tot bijna zwart. Slibben uit hoogbelaste systemen bestaan voornamelijk uit Gram-negatieve bacteriën, in slibben uit laagbelaste installaties zijn daarnaast ook veel Gram-positieve soorten aanwezig. De aanwezigheid van Gram-positieve soorten draagt bij tot een steviger vlok (zie ook par. 4.1).

Schimmels en protozoën/metazoën worden met Gram niet of niet egaal gekleurd.

Bij enkele draadvormende bacteriën, in het bijzonder Type 0041, kleuren soms niet alle delen van een draad op dezelfde manier. Dit wordt meestal veroorzaakt door de hechting van andere bacteriën aan de draden. Deze zijn dan enigszins afgeschermd, waardoor de blauwe kleurstof niet voldoende kan doordringen. In zo'n geval wordt bij de beoordeling van het resultaat van de kleuring voornamelijk gelet op de losliggende uiteinden van de draden.

Bij sommige soorten bacteriën wordt het resultaat van de kleuring door de leeftijd van de cellen bepaald. Jonge cellen kleuren rood, oudere blauw. Ook dit kan dus tot twee kleuren in één draad leiden.

Opmerkingen

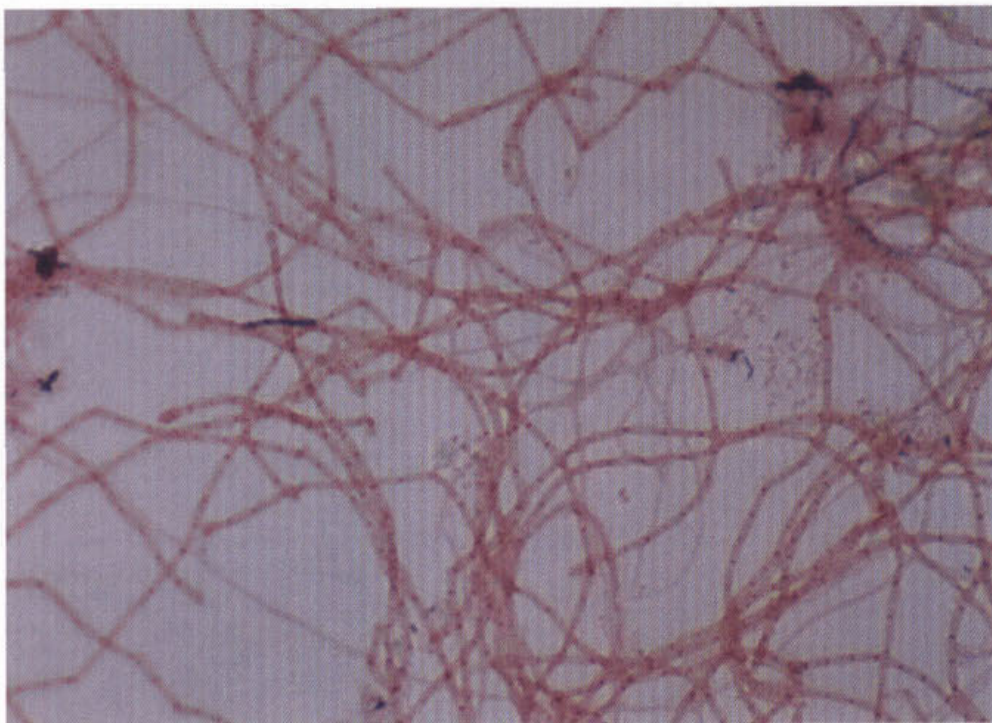
- Het merendeel van de oplossingen kan kant en klaar gekocht worden. In de literatuur staan tientallen verschillende recepten voor de Gram-kleuring. Voor draadvormende organismen blijkt bovenstaand recept een mooi contrast te geven.
- De meeste oplossingen zijn vrijwel onbeperkt houdbaar. Oplossing C (niet de voorraadoplossing) moet 1 maal per maand vernieuwd worden.
- De objectglaasjes moeten goed ontvet zijn.
- De preparaten moeten met helderveld bekeken worden; met fase-contrast is het verschil tussen rood en blauw minder duidelijk.
- Het preparaat mag niet teveel slibdeeltjes bevatten. De overmaat kleurstof kan dan niet meer via spoelen worden verwijderd. Bij het bestuderen zijn dan grote "plakraten" kleurstof te zien. Als dat het geval is, moet de kleuring worden overgedaan met een 'dunner' preparaat.

2.6.2 Neisser kleuring

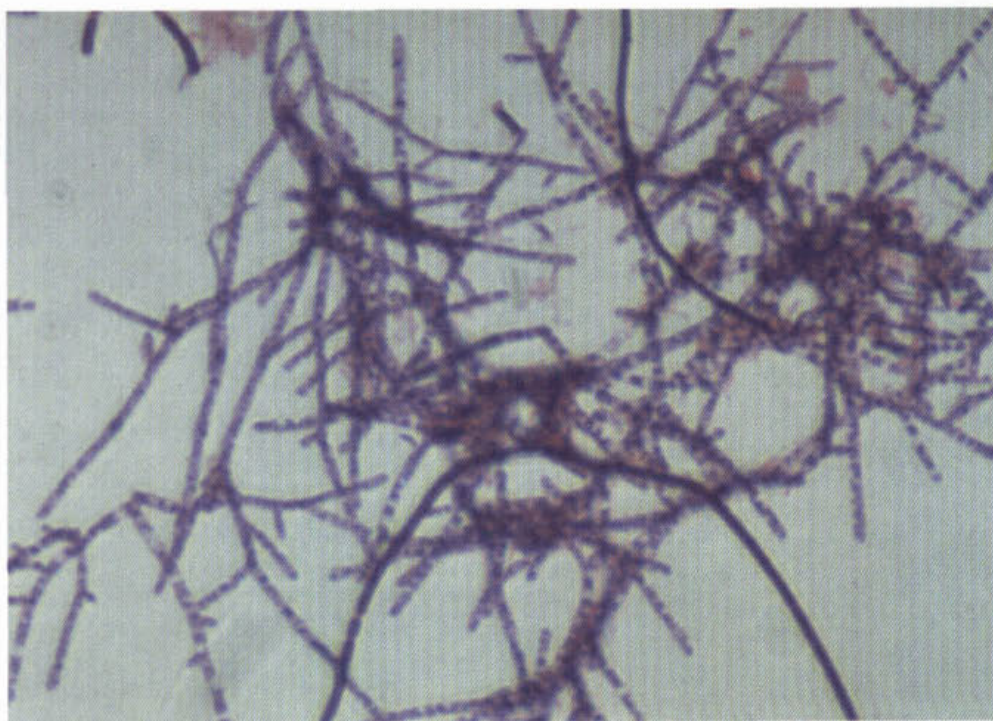
De kleuring volgens Neisser is een test op de aanwezigheid van in de cellen opgeslagen polyfosfaten (= reservestoffen). Dit is een onmisbaar hulpmiddel voor het identificeren van bepaalde soorten draadvormende bacteriën. Daarnaast kunnen met deze kleuring ook de Bio-P-bacteriën, die verantwoordelijk zijn voor biologische fosfaatverwijdering, zichtbaar gemaakt worden.

Benodigde oplossingen

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



Figuur 2 Gram-negatieve bacteriën (1250 x).



Figuur 3 Gram-positieve soorten (1250 x).

Procedure voor de kleuring

- Maak een droogpreparaat.
- Breng een vers bereid mengsel van 2 delen A en 1 deel B op het preparaat; contacttijd 10-15 sec., daarna de overmaat kleurstof van het glaasje af laten lopen.
- Oplossing C opbrengen; contacttijd 45 sec..
- Glaasje spoelen met leidingwater (waterstraal tegen de achterkant van het glaasje).
- Preparaat laten drogen en vervolgens bekijken met een 100 x helderveldobjectief. Het drogen kan worden versneld door het meeste water eerst voorzichtig met filtreerpapier (niet schuiven!) te verwijderen.

Resultaten

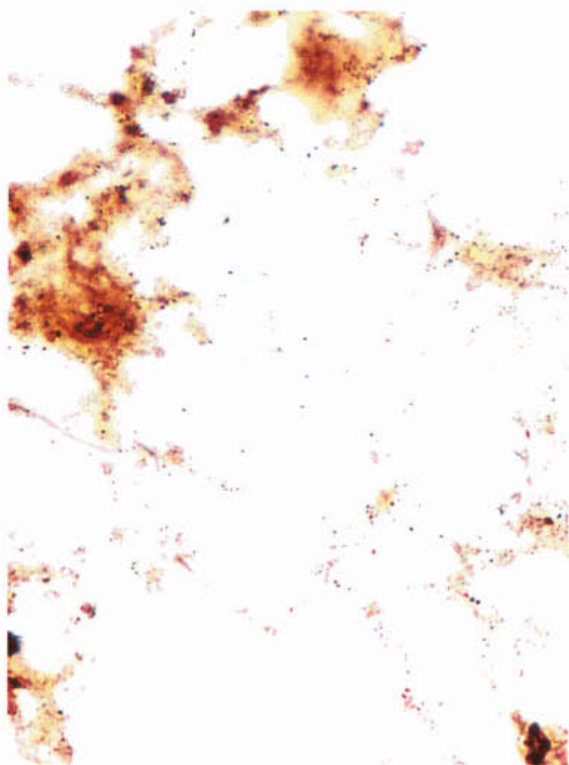
Neisser-negatieve cellen kleuren niet of nauwelijks (enigszins bruin of geel; figuur 4). Bij Neisser-positieve bacteriën kunnen drie hoofdgroepen worden onderscheiden.

1. Draadvormende bacteriën die volledig grijsblauw gekleurd zijn (figuur 5). Dit betreft bijna altijd *Nostocoida limicola* of Type 0092.
2. Draadvormende bacteriën die blauwzwart gekleurde bolletjes polyfosfaat bevatten (figuur 6). Zonder kleuring kunnen deze granulen met een lichtmicroscop vaak niet duidelijk worden waargenomen. Bij een veel sterkere vergroting (elektronenmicroscopie) zijn ze wel duidelijk zichtbaar (figuur 7). Deze paarsgewijs aanwezige bolletjes zijn overigens een belangrijk determinatiekenmerk voor *Microthrix parvicella*.
3. Kolonies van meestal blauwzwart gekleurde cellen (figuur 8 en 9). Dit zijn Bio-P-bacteriën. Het is niet met zekerheid bekend in hoeverre de vorige twee groepen een rol spelen bij biologische defosfatering. Er is overigens nogal wat variatie in de mate waarin dit soort kolonies met Neisser gekleurd wordt. Soms is de tint veel lichter, of wordt slechts een gedeelte van de cel donker gekleurd.

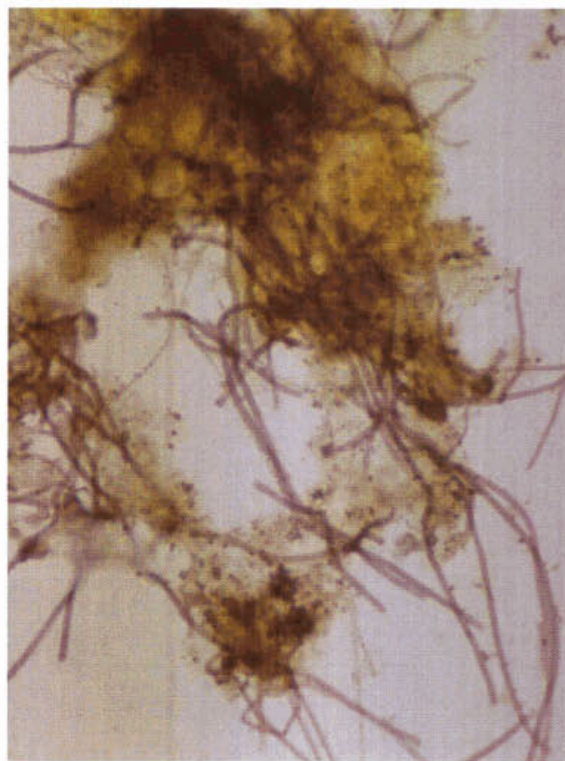
Opmerkingen

- De oplossingen A t/m C zijn vrijwel onbeperkt houdbaar. Ze kunnen bij een chemicaliën-firma kant en klaar gekocht worden.
- Neisser-negatieve draden hebben vaak zo weinig kleur, dat ze nauwelijks terug te vinden zijn in een microscopisch preparaat.
- Bij *M. parvicella* zijn de polyfosfaatgranulen vaak het grootst in het jaargetijde waarin deze bacterie het beste groeit (de winter).
- Incidenteel worden ook sterk lichtbrekende zwavelbolletjes met Neisser donker gekleurd.

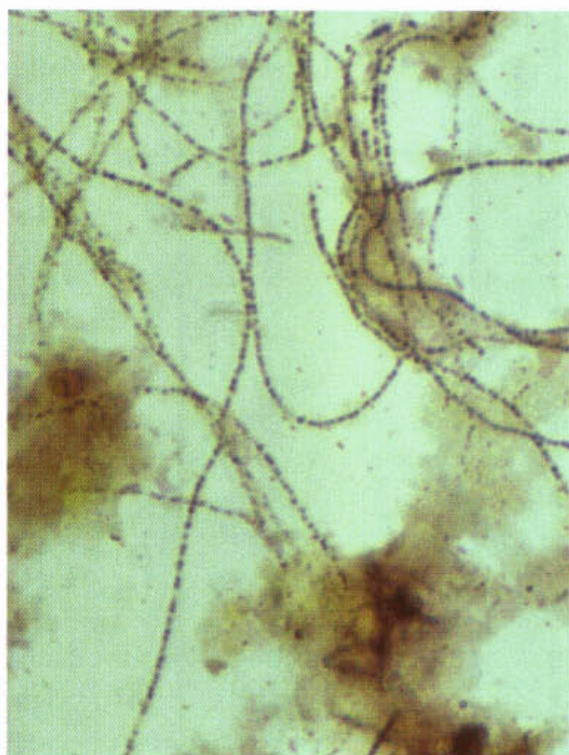
- Het gedurende enkele dagen in een koelkast bewaren van het slib heeft nauwelijks invloed op het resultaat van de Neisser kleuring. Het is dus niet nodig om het slib "op te frissen" via b.v. beluchten.



Figuur 4 Neisser-negatieve draden (900 x).



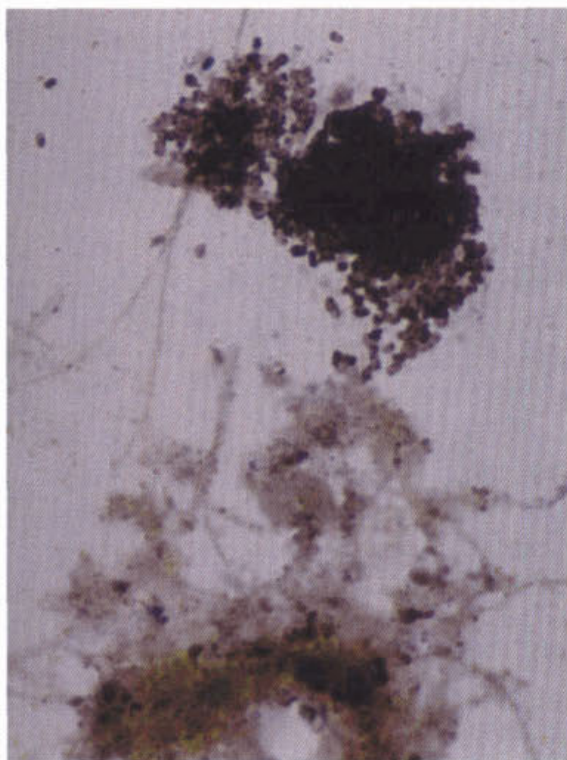
Figuur 5 Met Neisser grijsblauw gekleurde Type 0092 draden (900 x).



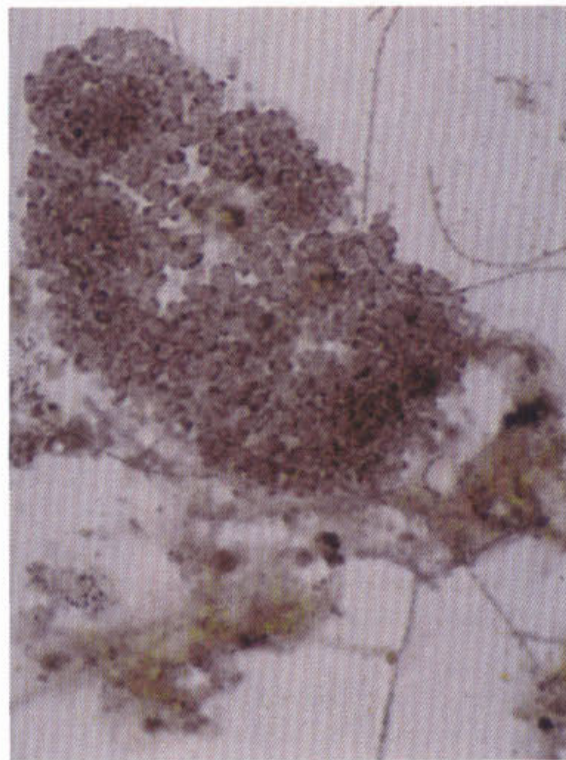
Figuur 6 Met Neisser blauwzwart gekleurde bolletjes in *M. parvicella* draden (900 x).



Figuur 7 Elektronenmicroscopische opname van poly-P-granulen in *M. parvicella* (26300 x).



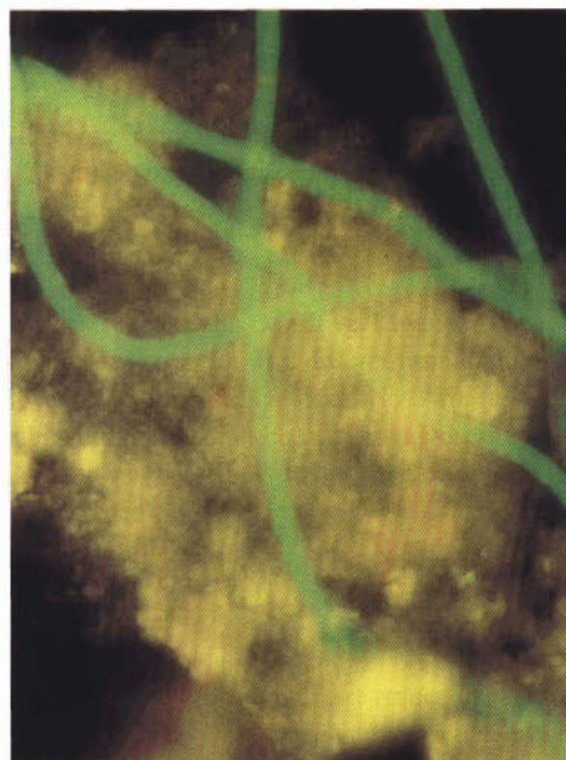
Figuur 8 Kolonie van poly-P-bacteriën in actief-slib. Gekleurd volgens Neisser (900 x).



Figuur 9 Kolonie van poly-P-bacteriën in actief-slib. Gekleurd volgens Neisser (900 x).



Figuur 10 Zwavelgranulen in Thiothrix draden (900 x).



Figuur 11 Type 021 N draden in actiefslib gelabeld met een fluorescerende 'probe' (900 x). Foto beschikbaar gesteld door Bioclear.

2.7 Zwavelopslagtest

Sommige soorten draadvormende bacteriën kunnen, indien ze groeien in aanwezigheid van gereduceerde zwavelverbindingen zoals sulfiden, zwavelbolletjes opslaan in hun cellen. Deze bolletjes bestaan uit elementaire zwavel dat als tussenproduct (reservestof) wordt opgeslagen. Het gaat hierbij om de soorten *Beggiatoa*, *Thiothrix*, Type 021 N (soms) en Type 0914. De zwavelbolletjes zijn echter niet altijd aanwezig. Dit bemoeilijkt een correcte identificatie. Door een behandeling met Na_2S is het mogelijk om vooral *Thiothrix* soorten in een kort tijdsbestek veel S-granulen te laten opslaan.

Werkwijze

Meng een hoeveelheid actiefslib met een even groot volume van een Na_2S -oplossing (200 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ per 100 ml). Belucht het mengsel 15-30 minuten. Controleer daarna microscopisch of de cellen zwavelbolletjes hebben opgeslagen. Deze zijn bij een vergroting van minimaal 400 x duidelijk te zien.

Resultaat

Thiothrix sp. slaan grote, sterk lichtbrekende granulen op (figuur 10). In een jong stadium zijn de bolletjes niet zo lichtbrekend en daardoor zwarter. In de cellen van andere draadvormende bacteriën worden meestal geen of slechts kleine S-bolletjes gevormd. Het voorbehoud betreft het soort Type 021 N, die soms ook zwavel opslaat.

2.8 Overige technieken

Stereomicroscopie

Met een stereomicroscop krijgt men een driedimensionaal beeld van de actiefslibvlokken. Helaas is de vergroting beperkt (max. circa 50 x), waardoor veel details niet/slecht zichtbaar zijn. Voor het tellen van grote organismen in slib, bijvoorbeeld bepaalde soorten wormen, is dit instrument wel zeer geschikt.

'Genetische probes'

Het is tegenwoordig mogelijk om een stukje van het erfelijk materiaal van een micro-organisme te merken met een fluorescerende label. Wanneer zo'n 'probe' aan slib wordt toegevoegd, dan bindt deze zich zeer specifiek aan het organisme met dezelfde genetische code. Met fluorescentie-microscopie kan dit organisme dan heel duidelijk binnen de gemengde slibpopulatie getraceerd worden (figuur 11). Dit is een prachtige techniek voor onderzoeksdoeleinden. Voor kwaliteitscontrole van actiefslib, waarbij diverse kenmerken van de biomassa gelijktijdig beoordeeld worden, is deze werkwijze echter niet geschikt. Met genetische probes kan wel aanvullende informatie worden verkregen.

3 Microscopisch onderzoek van actiefslib

Het microscopisch beeld levert informatie over een aantal visueel waarneembare eigenschappen van actiefslib. Deze kennis is nodig bij de kwaliteitsbeoordeling van het slib. Bovendien kan zo een diagnose gesteld worden indien de installatie niet naar verwachting functioneert. De analyse levert echter geen directe informatie over de activiteit van de biomassa. Deze moet op andere manieren worden bepaald.

De frequentie waarmee slibonderzoek uitgevoerd moet worden is gekoppeld aan de slibleeftijd. Bij korte slibleeftijden (dagen) is een frequentie van 1x/1 à 2 weken noodzakelijk om veranderingen in de vloksamenstelling tijdig te kunnen signaleren. Bij slibleeftijden van weken kan met een frequentie van 1x/1 à 2 maanden worden volstaan.

3.1 Monsternamen en -behandeling

Het onderzoek wordt uitgevoerd met slib uit de beluchtingsruimte. Het is zinvol om deze altijd op dezelfde plaats te bemonsteren, b.v. bij de overstort naar de nabezinktank. De fles wordt voor circa $\frac{1}{3}$ gevuld met slib, om de aërobe condities in het slib zoveel mogelijk te handhaven.

Het slib mag niet worden ingedikt. Conserveren, koelen uitgezonderd, is ook niet toegestaan, omdat veel levende micro-organismen dan doodgaan.

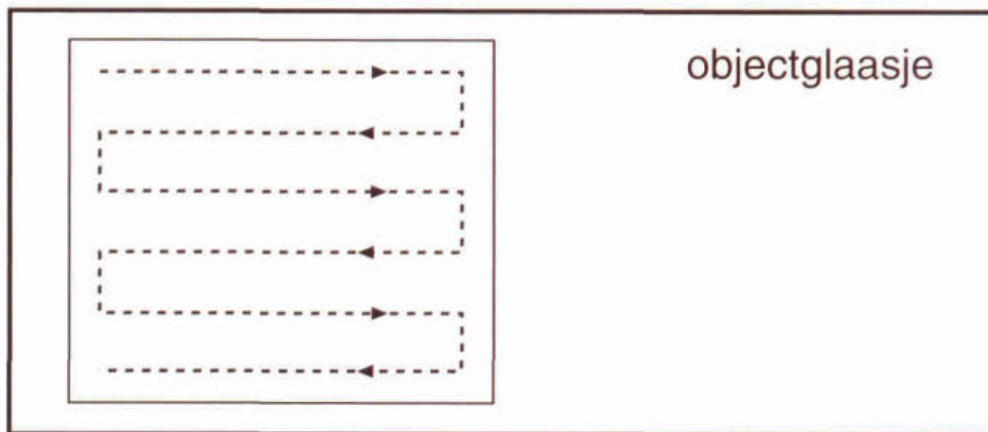
Het microscopisch onderzoek moet in beginsel met zo vers mogelijk slib worden uitgevoerd. Monsters die niet direct geanalyseerd kunnen worden, moeten gekoeld (4-7 °C) worden bewaard, bij voorkeur in niet afgesloten flessen. Invriezen is niet toegestaan, omdat hierdoor de structuur van de vlok aangetast wordt. Tijdens het opslaan veranderen de eigenschappen van het slib geleidelijk; dit gaat sneller naarmate het slib hoger belast is geweest. Zoogloea kolonies, spirocheten en sommige soorten protozoën/metazoën verdwijnen vaak als eerste. Vervolgens begint de vlok enigszins te desintegreren, waardoor het aantal niet-vlokgebonden cellen toeneemt en verdwijnen eventueel aanwezige zwavelgranulen. Ook verschijnen micro-organismen die karakteristiek zijn voor zuurstofloze omstandigheden, zoals spirillen. Slibben uit hoogbelaste installaties (geen nitrificatie) moeten daarom binnen 36 uur geanalyseerd worden. Materiaal uit laagbelaste systemen (nutriëntenverwijdering) kunnen 1 à 2 dagen langer bewaard worden voordat de kenmerken wezenlijk beginnen te veranderen.

3.2 Werkwijze bij het uitvoeren van de analyse

Van het te onderzoeken slib worden preparaten gemaakt voor het microscopisch onderzoek en de twee kleuringen. Vanzelfsprekend moet voorafgaand hieraan de inhoud van de monsterfles goed worden gemengd, door deze rustig met de hand te

schudden. Bij goede menging is één druppel slib representatief voor de inhoud van de monsterfles, c.q. de volledige inhoud van de beluchttingsruimte!!

Het microscopisch beeld van een bepaald actief-slib moet altijd gebaseerd zijn op een aantal waarnemingen. Hiermee wordt bedoeld dat niet volstaan kan worden met het vastleggen van de kwaliteit van enkele slibvlokjes, maar dat in een bepaald preparaat steeds een groot aantal vlokken bekeken moet worden voordat iets gezegd kan worden over de gemiddelde kwaliteit van de vlok in het betreffende slib. Hetzelfde geldt voor de meeste andere kenmerken. Dit betekent dat het preparaat systematisch bekeken moet worden (figuur 12). Als men dat niet doet - en dus min of meer lukraak de kruistafel verdraait - bekijkt men vaak slechts een te klein gedeelte van het preparaat.



Figuur 12 Schematische weergave van de manier waarop een preparaat bekeken moet worden.

3.3 Het microscopisch beeld

Een niet-getraind oog ziet door een microscoop een mengsel van sterk heterogeen samengestelde en onregelmatig gevormde conglomeraten (= vlokken). Zo hier en daar zijn deeltjes waarneembaar die zich verplaatsen, terwijl tussen de vlokken soms draderige structuren aanwezig zijn. De kleur van de vlokbestanddelen kan variëren van grijsgeel tot bruinzwart.

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

- *vorm, structuur en afmetingen van de vlokken;*
- *samenstelling van de vlokken.* Is sprake van een duidelijk waarneembare variatie van micro-organismen; zijn karakteristieke bacteriegroepen aan- of afwezig; zijn in de vlokken veel (an)organische, niet-levende deeltjes aanwezig, enz.;

- *draadvormende micro-organismen*. Zijn deze organismen in het slib aanwezig; welke soorten kunnen onderscheiden worden;
- *niet-vlokgebonden bacteriën*. Is vrijwel al het celmateriaal in de vorm van slibvlokken aanwezig of is ook sprake van veel losse bacteriecellen tussen de vlokken;
- *andere organismen*. Welke protozoën etc. zijn in het slib aanwezig en in welke aantallen.

Over al deze slibkarakteristieken, die iets zeggen over de procesomstandigheden in de installatie, kan met behulp van een fase-contrast microscoop informatie verzameld worden.

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

3.4 Keuze van het juiste objectief

Bij het uitvoeren van de analyse wordt gestart met een vergroting van 100 à 200 x. Deze vergroting is het meest geschikt om de volgende informatie te verzamelen:

- de vorm, structuur en grootte van de slibvlokken;
- het tellen en identificeren van protozoën en metazoën;
- het schatten van het aantal draadvormende organismen;
- het vaststellen van een aantal kenmerken van de draadvormers. Dit betreft met name hun vorm, de lengte van de draden, de hechting van andere micro-organismen op hun oppervlak en de plaats waar ze aanwezig zijn. Bij dit laatste gaat het om het onderscheid tussen vlokgebonden of juist vrij in de vloeistof. Dit is een belangrijk hulpmiddel bij het terugvinden van draadvormende bacteriën in gekleurde preparaten;
- het waarnemen van zogenaamde monokolonies. Dit zijn vlokken of onderdelen hiervan die uit één soort cellen lijken te bestaan. Monokolonies hebben soms een karakteristieke vorm. Bio-P-bacteriën groeien ook meestal in monokolonies. Monokolonies zijn overigens lang niet altijd aanwezig.;
- het tellen van eventueel aanwezige vezels of van anorganische deeltjes zoals zandkorreltjes.

Vervolgens wordt de vergroting opgevoerd tot 400 à 500 x, waardoor deeltjes met een diameter van 0,5 à 1,0 μm duidelijk kunnen worden waargenomen. Nu wordt met name gelet op de volgende aspecten:

- de structuur en de afmetingen van draadvormende bacteriën en van kleinere protozoën zoals flagellaten;
- niet vlokgebonden bacteriecellen. Deze hebben soms een karakteristieke vorm (spirocheten en spirillen);

- de stevigheid van de vlokken;
- de variatie aan celvormen in de vlok (diversiteit) en de aanwezigheid van kleine monokolonies.

Soms blijkt het bovendien nodig te zijn om waarnemingen, gedaan bij een lagere vergroting, enigszins bij te stellen.

Tenslotte wordt overgeschakeld op de 1000 x vergroting. Nu kunnen de laatste kenmerken van de draadvormende bacteriën geregistreerd worden. Dit betreft (1) het al dan niet zichtbaar zijn van de celwanden en zo ja, welke vorm de cellen hebben en (2) de aanwezigheid van reservestoffen.

De draadvormers kunnen nu geïdentificeerd worden zodra ook de resultaten van de kleuringen volgens Gram en Neisser bekend zijn.

3.5 Registratie van de waarnemingen

De resultaten van het onderzoek worden vastgelegd op een analyseformulier (zie volgende pagina). De analyse dient uit te monden in een kwaliteitsbeoordeling: goed, matig of slecht (zie hoofdstuk 7). Tevens is het uit het oogpunt van procesbeheer gewenst dat de resultaten vergeleken worden met eerder uitgevoerde analyses. Zo kan worden vastgesteld of sprake is van een bepaalde ontwikkeling in de tijd (trend).

Bij het registreren, c.q. kwantificeren van de waarnemingen doet zich een aantal problemen voor. De uitkomst van een chemische analyse kan in een getal uitgedrukt worden: de concentratie van een bepaalde verbinding. Op deze manier is een bepaalde situatie afdoende vastgelegd en ook voor anderen te begrijpen.

De waarnemingen van een microscopische slibanalyse kunnen echter niet zomaar in exacte getallen vertaald worden. Het is in theorie weliswaar mogelijk om alles wat men waarneemt door middel van tellen en meten vast te leggen, maar deze procedure is buitengewoon arbeidsintensief. Het is ook zinloos, omdat voor het beoordelen van de slibkwaliteit alleen de orde van grootte van de meeste kenmerken relevant is. Het kwantificeren van de visuele waarnemingen moet dus op andere manieren gebeuren. Voorkomen moet worden dat subjectieve maatstaven bij het microscopisch onderzoek het onderling vergelijken van uitkomsten verhinderen. Een bepaalde vlokstructuur moet niet door de ene waarnemer als 'redelijk goed' en door iemand anders met 'slecht' gekarakteriseerd worden.

De praktijk heeft uitgewezen dat dit probleem grotendeels ondervangen kan worden door referentiefoto's te gebruiken. Door het microscopisch beeld te vergelijken met de referenties van het betreffende kenmerk, kan de indeling in een bepaalde groep worden vastgesteld. Daarnaast moeten aantallen micro-organismen soms globaal geschat worden. Op het analyseformulier worden hiervan enkele voorbeelden gegeven. Praktisch alle waarnemingen kunnen zo in een getal worden uitgedrukt. In de volgende hoofdstukken wordt dit onderwerp meer in detail besproken.

Resultaat Microscopisch Slibonderzoek

Installatie:

Datum monstername:	Analyse door:
Nummer monster:	Datum analyse:

Slibkwaliteit	
goed	☐
matig	☐
slecht	☐
Trend ¹⁾	
beter	☐
gelijk	☐
slechter	☐
n.v.t.	☐

(kenmerkende foto)

1) in vergelijking met het laatste monster

Draadvormers ^{a)}		FI =		Proto-/Metazoën ^{b)}		Diverse kenmerken	
<i>M. parvicella</i>		Type 021N		Ciliaten		Vloktype ^{d)}	
Type 0041/0675		<i>Thiotrix</i>		Flagellaten		Losse cellen ^{c)}	
Type 0092		<i>S. natans</i>		Amoeben		Zoogloeas ^{b)}	
Type 1851		<i>H. hydrossis</i>		Schaalamoeben		Poly-P-kolonies ^{b)}	
Type 0803		<i>N. limicola</i>		Heliozoën		Andere monokolonies ^{b)}	
Type 0914		Type 1701		Rotiferen		Spirillen ^{b)}	
Actinomyceten				Nematoden		Spirocheten ^{b)}	
		Div. soorten		Wormen		Vezels ^{b)}	

- a) Schaal 0-5 = geen - zeer veel draadvormende organismen

b) Schaal 0-3 = geen - tientallen cellen/kolonies per preparaat

c) Schaal 0-3 = geen - honderden cellen per beeldveld
- d) 1 karakteristiek voor lage belastingen + oppervlaktebeluchter

2 karakteristiek voor lage belastingen + bellenbeluchting

3 karakteristiek voor hoge belastingen

4 opvallend veel kleine vlokjes (< ca. 25 µm)

5 anders; zie opmerkingen

Opmerkingen:
.....
.....
.....
.....
.....

4 Kenmerken van actief-slibvlokken

Actief-slibvlokken zijn conglomeraten van levende en dode bacteriecellen, waaronder vaak ook draadvormende soorten, geprecipiteerde zouten en ingevangen anorganische deeltjes (zand) en organische vezels. Het geheel wordt bij elkaar gehouden door een slijmmatrix van polymere verbindingen rond de cellen en chemische bindingskrachten, waarbij vooral tweewaardige kationen zoals Ca^{2+} een belangrijke rol spelen. Rond de vlokken en in het water tussen de vlokken zijn vrijzwemmende bacteriën, protozoën en soms ook hogere organismen aanwezig. Het percentage levende cellen neemt toe naarmate de slibbelasting in de installatie hoger is. Overigens is het verschil tussen levende en dode cellen vaak niet duidelijk zichtbaar, dit kan alleen via nader onderzoek worden vastgesteld.

De procesbeheerder wil graag stevige, compacte vlokken die goed bezinken. In de praktijk blijkt deze 'ideale vlok' echter lang niet altijd aanwezig te zijn. Controle van de vlokkwaliteit is daarom een belangrijk onderdeel van microscopisch slibonderzoek.

In dit hoofdstuk wordt een aantal kenmerken van actief-slibvlokken besproken, inclusief enkele groepen organismen die strikt genomen niet bij de vlok horen, omdat ze los in de waterfase aanwezig zijn.

Voor informatie over draadvormende organismen, licht slib en protozoën/metazoën wordt verwezen naar de desbetreffende hoofdstukken.

4.1 Morfologische kenmerken

Morfologie is afgeleid van het Griekse woord 'morphè' dat vorm betekent. In deze handleiding wordt het begrip ruimer gehanteerd en omvat het tevens de structuur, de stevigheid en het formaat van de actief-slibvlokken.

Bij het onderzoek naar de morfologische kenmerken van het actiefslib in een bepaalde installatie zal blijken dat altijd sprake is van een forse variatie bij de diverse kenmerken. Er kan/moet daarom worden volstaan met een globale karakterisering van de biomassa. Er moet alleen worden vastgesteld of de morfologische kenmerken overeenstemmen met die van het vloktype van de betreffende installatie (zie paragraaf 4.4). Als dat niet het geval is, moet het slib gekarakteriseerd worden op basis van de hierna vermelde kenmerken.

Vorm

De vorm van actief-slibvlokken kan variëren van min of meer afgerond (figuur 13) tot uitgesproken onregelmatig (figuur 14). De bezinksnelheid van de vlokken neemt af naarmate deze onregelmatiger gevormd zijn.

Zoals figuur 13 illustreert zijn afgeronde vlokken niet echt rond, maar eerder hoekig. Praktisch ronde vlokken komen bijna nooit voor.

In veel installaties zijn de vlokken min of meer afgerond; dit is dus de meest gangbare vlokform. Bij de combinatie van bellenbeluchting plus een relatief hoge slibbelasting ($> \text{circa } 0,3 \text{ kg BZV/kg d.s. dag}$) hebben de vlokken echter soms een uitgesproken onregelmatige vorm. Ook de groei van vlokvormende bacteriën langs draden die uit de vlok steken kan tot deze vlokform leiden.

Structuur

Bij de structuur van de vlokken worden als uitersten onderscheiden:

- compacte vlokken, waarin de bacteriën dicht op elkaar gestapeld zijn. De vlokken zijn veelal bruin gekleurd (figuur 15);
- open vlokken, waarbij het water in feite tussen de vlokdeeltjes door kan stromen (figuur 16).

Vlokken bezinken sneller naarmate ze compacter zijn.

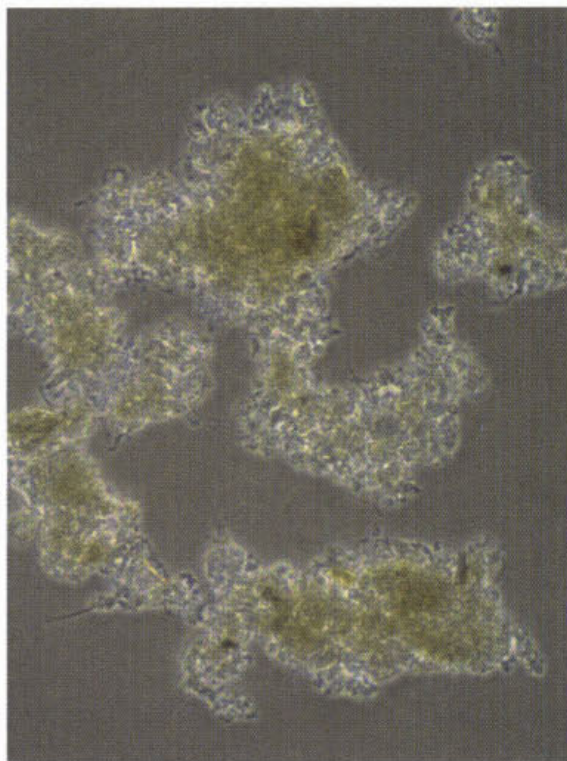
De combinatie van bellenbeluchting met een slibbelasting $< \text{circa } 0,3 \text{ kg BZV/kg d.s. dag}$ gaat gepaard met compacte vlokken, zelfs als veel draadvormende bacteriën aanwezig zijn. Bij hogere slibbelastingen en dit beluchtingssysteem zijn de vlokken vaak onregelmatig gevormd en daardoor meer open.

De toepassing van oppervlaktebeluchters leidt tot de vorming van veel minder compacte vlokken. Het is vaak duidelijk te zien dat de vlok in feite uit kleinere vlokdeeltjes bestaat. Dit is het gevolg van de grote turbulentie in het water bij de beluchter, waardoor veel (grotere) vlokken stukgeslagen worden. Zo lang draadvormende bacteriën ontbreken, aggregeren de vlokdeeltjes vervolgens wel weer tot grotere eenheden, maar het blijft zichtbaar dat deze in feite uit 'subvlokjes' bestaan. Als wel draadvormende bacteriën aanwezig zijn, vooral als dit *Microthrix parvicella* betreft, kunnen zogenaamde agglomeraten ontstaan. Dit zijn open vlokken, waarin vlokdeeltjes door draden met elkaar zijn verbonden (figuur 16).

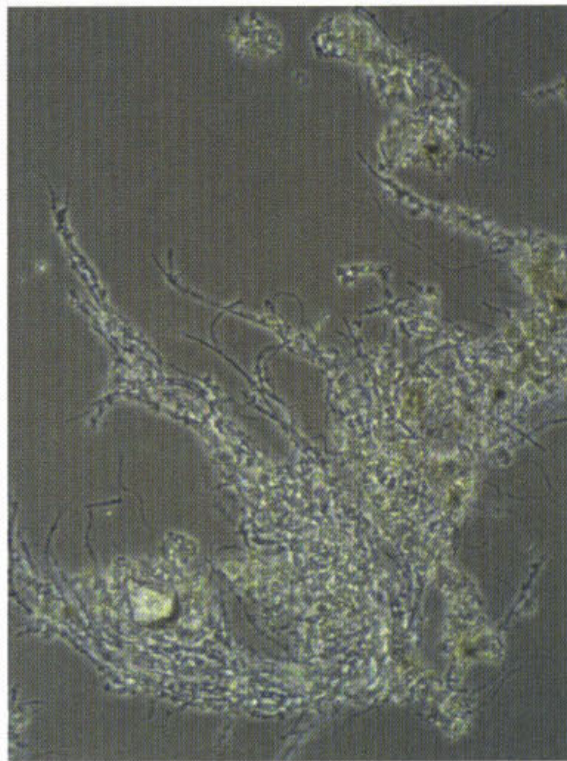
Stevigheid

Bij het microscopisch slibonderzoek moet onderscheid worden gemaakt tussen 'stevige' (figuur 17) en 'losse' (figuur 18) vlokken.

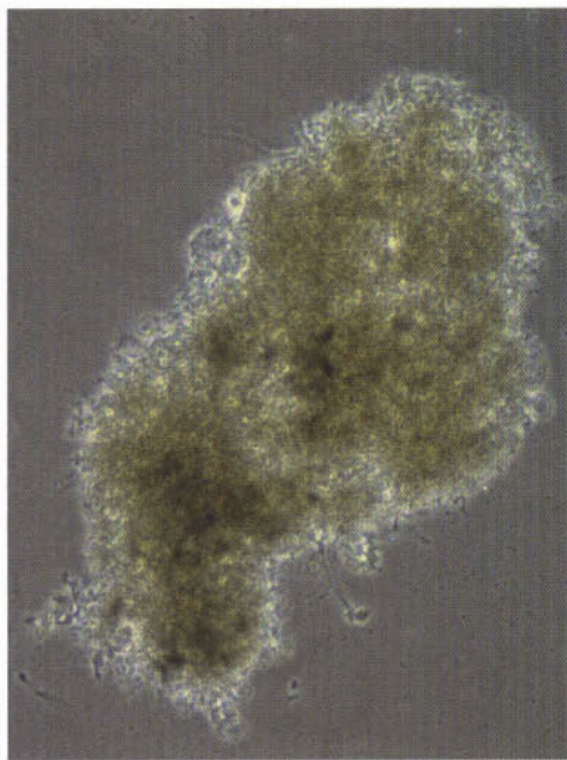
Bij een stevige vlok is sprake van een duidelijke scheiding tussen de vlok en de omringende vloeistof. Dit is bij een losse vlok niet het geval. Een losse vlokstructuur gaat vrijwel altijd gepaard met veel niet-vlokgebonden celmateriaal. De overgang van vlok naar vloeistof is niet scherp begrensd, doordat aan de randen van de vlokken veel cellen aanwezig zijn waarvan niet duidelijk is of ze nog wel vlokgebonden zijn. De vlok kan ook gemakkelijk beschadigd worden.



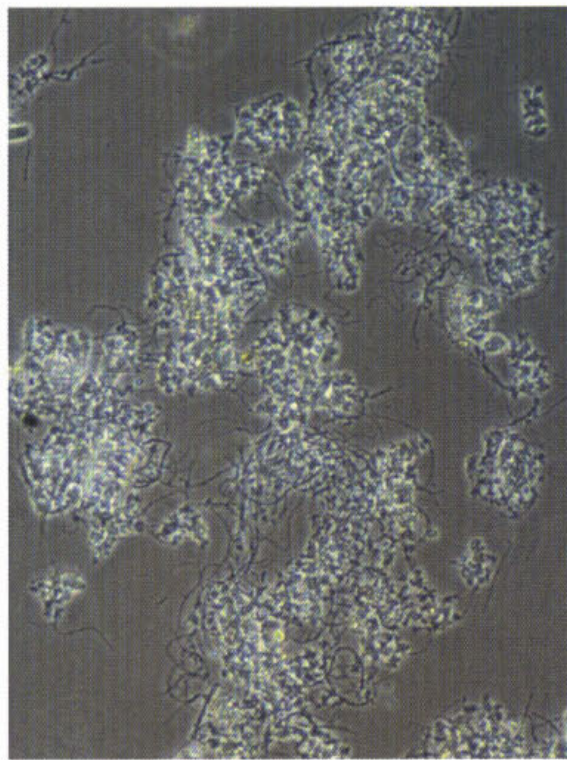
Figuur 13 Afgeronde slibvlokken (150 x).



Figuur 14 Vlokken met een onregelmatige vorm (150 x).



Figuur 15 Compacte slibvlok (150 x).



Figuur 16 Open vlok (150 x).

Bacteriën vormen vlokken om zich in voedselarme milieus te kunnen handhaven. Het biedt bescherming tegen predatoren zoals protozoën en het voorkomt uitspoeling. De noodzaak om vlokken te vormen neemt af naarmate meer voedsel beschikbaar is en snelgroeiende soorten in de populatie gaan domineren. De stevigheid van de vlokken wordt daarom vooral bepaald door de slibbelasting: naarmate deze hoger is worden de vlokken losser. Deze verschuiving in de populatie blijkt ook uit de resultaten van de Gram kleuring. Bij hoge belastingen bestaat de vlok hoofdzakelijk uit Gram negatieve bacteriën, bij lage slibbelastingen zijn ook veel Gram positieve cellen aanwezig. Gram positieve bacteriën hebben een hydrofoob ($\approx$ waterafstotend) celoppervlak. Ze prefereren daardoor hechting aan elkaar boven gesuspendeerd in het water aanwezig zijn.

Grootte

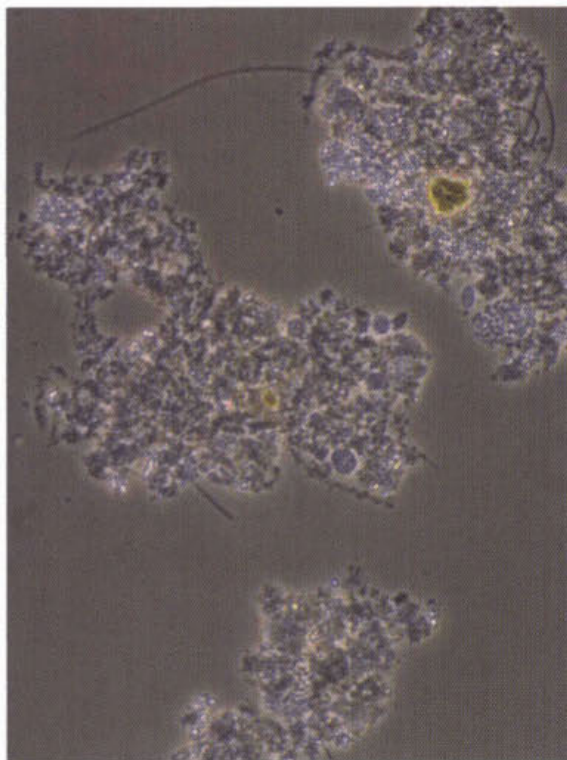
Wanneer we spreken over de afmetingen van een slibvlok dan wordt daar niet de grootte van de macroscopische slibvlokken mee bedoeld die gevormd worden zodra de slibmassa tot rust komt; zoals b.v. in een bezinkglas duidelijk waargenomen kan worden. Deze macroscopische vlokken, met een diameter van circa 10 mm, vertonen nauwelijks enige samenhang en vallen dan ook erg gemakkelijk weer uit elkaar. Zo'n conglomeraat bestaat uit talrijke veel kleinere deeltjes: de actief-slibvlokken. De grootte van deze vlokken kan variëren van 10 à 20 μm tot soms wel enkele mm's. De afmetingen van de vlokken worden bepaald met behulp van een geijkte micrometer in een oculair van de microscoop. Draden die uit de vlok steken worden niet meegerekend bij het vaststellen van de diameter.

Er worden drie grootteklassen onderscheiden:

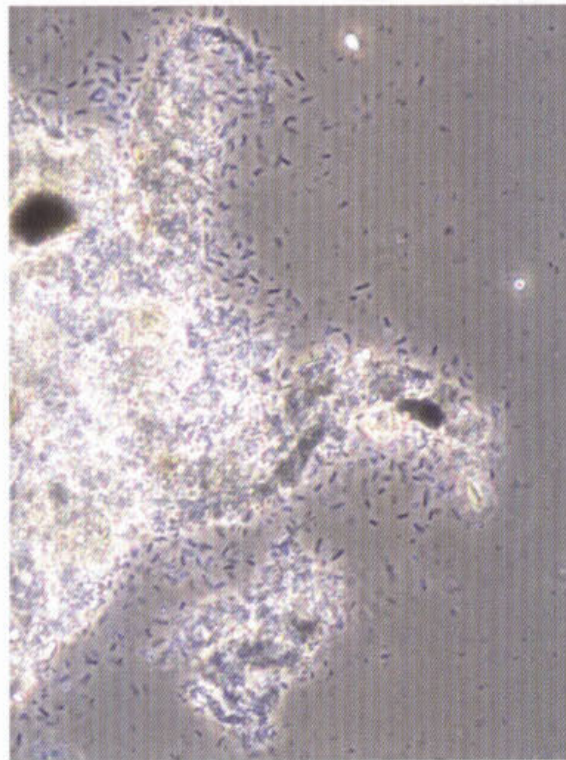
- kleine vlokken : diameter < 25 μm
- middelgrote vlokken : diameter 25-250 μm
- grote vlokken : diameter > 250 μm

Compacte vlokken bezinken beter/snelser naarmate ze groter zijn. De vloggrootte in een bepaald actiefslib is sterk variabel. Er zijn ook altijd wel kleine vlokken aanwezig. Mits hun percentage niet te hoog is, worden deze via invangen in de slibdeken (nabezinktank) alsnog uit het water verwijderd. Een hoog percentage kleine vlokken (> 50%) kan echter tot slibverliezen met het effluent leiden.

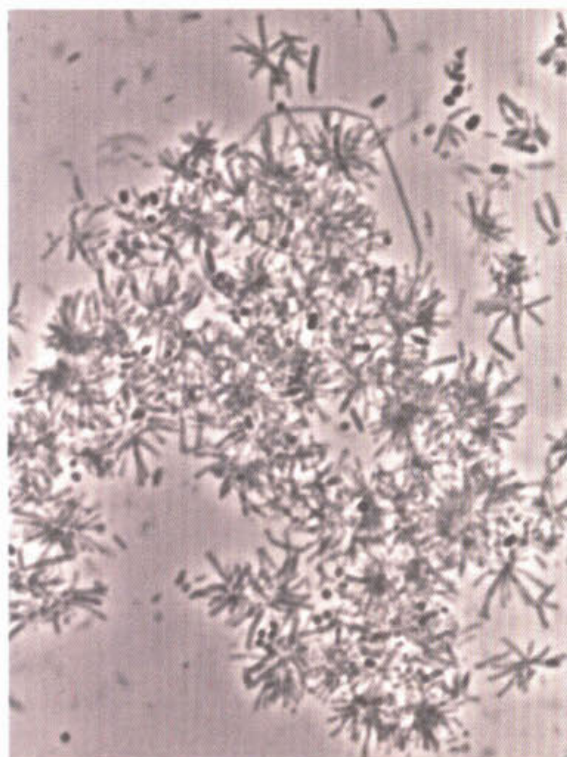
Het type beluchtingssysteem heeft grote invloed op de vloggrootte in de installatie. Bij het toepassen van oppervlaktebeluchters varieert de grootte van de vlokken van 25 μm tot 250 μm , met bellenbeluchting zijn veel vlokken aanmerkelijk groter (range: 25-1000 μm ; vaak > 500 μm).



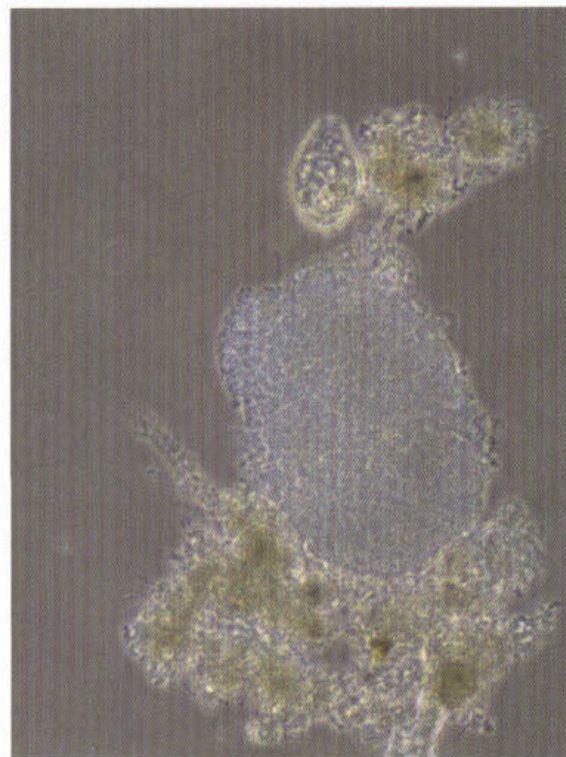
Figuur 17 Stevige vlok (300 x).



Figuur 18 Losse vlok (300 x).



Figuur 19 Vlok met een geringe diversiteit (900 x).



Figuur 20 Monokolonie (150 x).

Een hoog percentage kleine vlokken (> 20 à 30%) in een bepaalde installatie kan verschillende oorzaken hebben:

- complexerende verbindingen (b.v. EDTA) in het influent. Zulke verbindingen 'trekken' de tweewaardige kationen uit de vlok, waardoor deze uit elkaar valt in kleinere deeltjes;
- een extreem lage slibbelasting (< 0,025 kg BZV/kg d.s./dag). In dit geval wordt de desintegratie van de vlokken waarschijnlijk veroorzaakt door afbraak/consumptie van de polymere kapsels rond de cellen in de vlok;
- extreem turbulente omstandigheden in de beluchtingsruimte;
- het toepassen van de Al-zouten. Aluminiumionen veranderen waarschijnlijk de oppervlakte-eigenschappen van de (hydrofobe) cellen in de vlok;
- vergiftiging van het slib.

4.2 Samenstelling van de vlok

Diversiteit

Een slibvlok bestaat meestal uit een scala aan micro-organismen. Juist door deze grote soorten diversiteit is een actief-slibstelsel zo flexibel en kunnen veel verschillende verbindingen gelijktijdig afgebroken worden. Microscopisch (100 x objectief) kan een indruk van deze soortenrijkdom worden verkregen. Hierbij wordt gelet op de variatie aan vormen en afmetingen van de cellen in de vlokken. De cellen zijn overigens meestal ingebed in anorganisch materiaal (humeuze resten en dergelijke).

Bij een geringe diversiteit (figuur 19) is de installatie kwetsbaar, omdat de zuiveringsprestaties volledig afhankelijk zijn van het functioneren van een beperkt aantal soorten bacteriën. Bij een grotere soortenrijkdom kan de rol van bacteriën, die ophouden te functioneren, vaak overgenomen worden door andere micro-organismen.

Een geringe diversiteit van de vlokpopulatie komt alleen voor in hoogbelaste, industriële installaties die gevoed worden met een eenzijdig samengesteld influent. Het is een zeldzaam verschijnsel en om deze reden ook niet op het analyseformulier vermeld.

Monokolonies

In en tussen de slibvlokken zijn soms conglomeraten aanwezig die uit één type cellen lijken te zijn samengesteld (figuur 20). Deze worden bij elkaar gehouden door een soort slijmstof rond de cellen. Dit zijn zogenaamde monokolonies. Ze worden vooral waargenomen in installaties met nutriëntenverwijdering. Grootte en vorm van de monokolonies zijn sterk variabel; ze kunnen het formaat van actief-slibvlokken bereiken. Er worden vier groepen onderscheiden.

1. Zoogloea kolonies hebben vaak een kenmerkende, vingerachtige vorm (figuur 21). Hun aanwezigheid duidt op een slibbelasting > circa 0,1 kg BZV/kg d.s.-dag en/of tekorten aan bepaalde nutriënten. Overigens zijn Zoogloea kolonies alleen in verse monsters duidelijk te zien; bij het opslaan van slib in een koelkast verdwijnen ze na 2 à 3 dagen.
2. De bacteriën die bij biologische fosfaatverwijdering zijn betrokken vormen compacte, enigszins ronde kolonies. Ze kunnen zowel in de vlok (figuur 22) als in de waterfase (figuur 20) aanwezig zijn. In het laatste geval zijn ze duidelijk groter dan de monokolonies in de vlokken, waarvan de diameter vaak niet meer dan 10 à 20 µm bedraagt. Bio-P-monokolonies worden met Neisser blauw tot violet gekleurd (figuren 8 en 9).
3. Er kunnen ook monokolonies aanwezig zijn die sprekend op die van Bio-P-bacteriën lijken, maar die geelbruin met Neisser kleuren (figuur 23). Er zijn sterke aanwijzingen dat dit monokolonies van denitrificerende bacteriën zijn.
4. De vierde groep omvat monokolonies waarbij de cellen niet dicht op elkaar gestapeld zijn (figuur 24). De cellen zijn hierbij omgeven door een dikke slijmlaag. Hun aanwezigheid duidt, net als bij Zoogloea's, op een hoge slibbelasting en/of tekorten aan bepaalde voedingsstoffen.

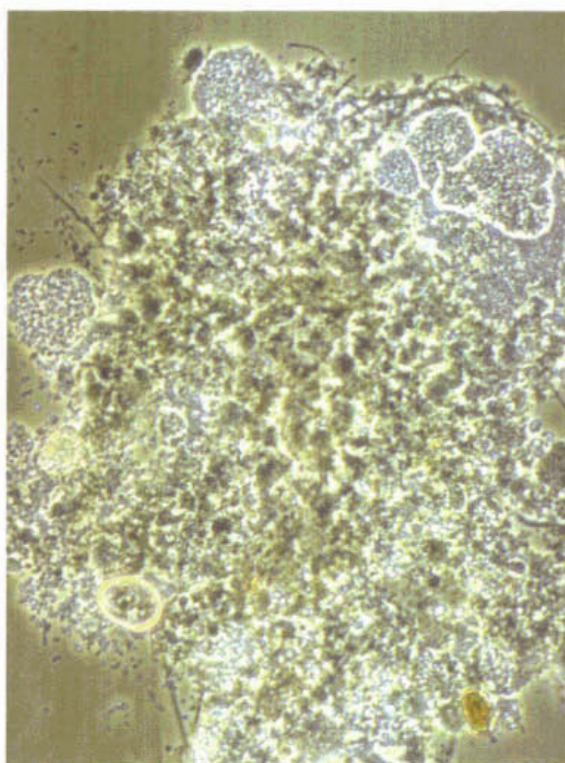
Voor het registreren van het aantal monokolonies wordt een schaal variërend van 0 (= afwezig) tot 3 (= tientallen kolonies/preparaat) gebruikt.

(An)organische deeltjes

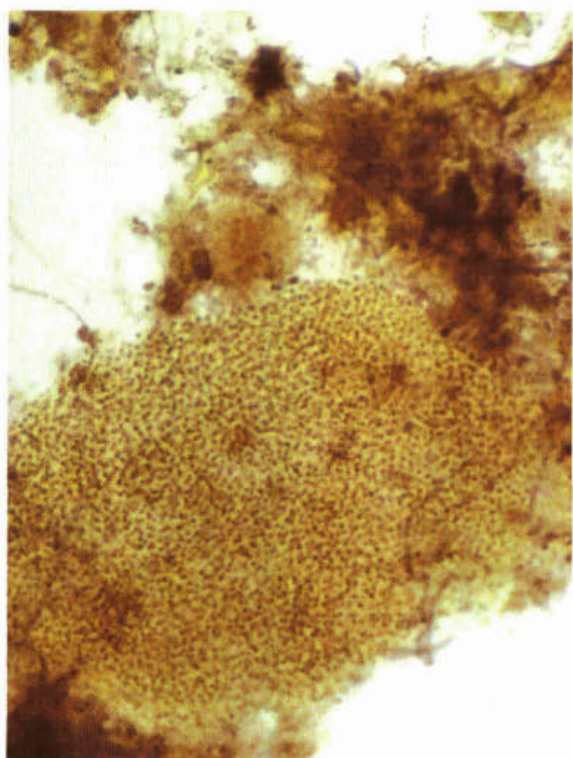
Een actief-slibvlok bestaat voor het grootste deel uit levende en dode bacteriecellen. Daarnaast zijn echter vaak ook macromoleculaire (an)organische deeltjes aanwezig die duidelijk niet van bacteriële oorsprong zijn. Het betreft deeltjes die met het influent zijn aangevoerd en vervolgens ingekapseld zijn door de slibvlokken. De organische deeltjes kunnen, behalve aan hun grootte, vooral herkend worden aan hun vezelige structuur (figuur 25). De anorganische deeltjes, voornamelijk zandkorreltjes etc., hebben een grotere brekingsindex dan het overige vlok materiaal. Zij vallen daarom op door hun relatief grote helderheid (figuur 26). De mate waarin dit soort deeltjes aanwezig is, wordt voornamelijk bepaald door de aan- respectievelijk afwezigheid van een zandvang en/of voorbezinktank.



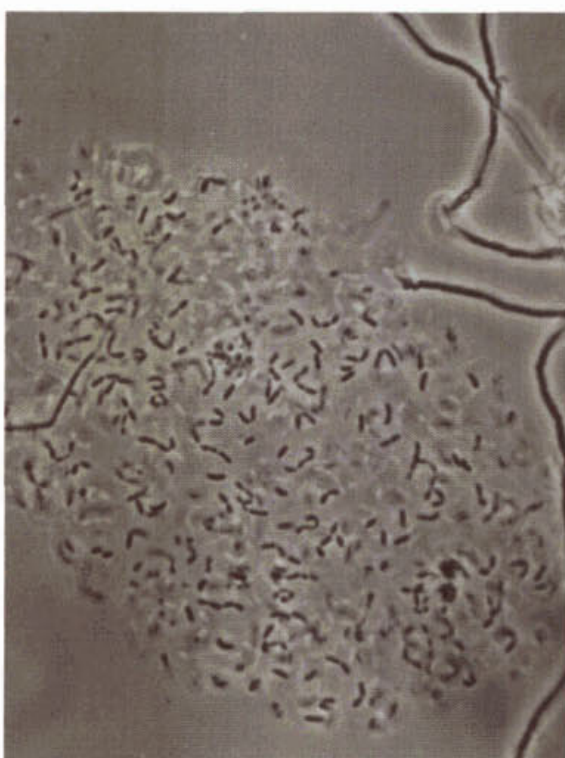
Figuur 21 Zoogloea (300 x).



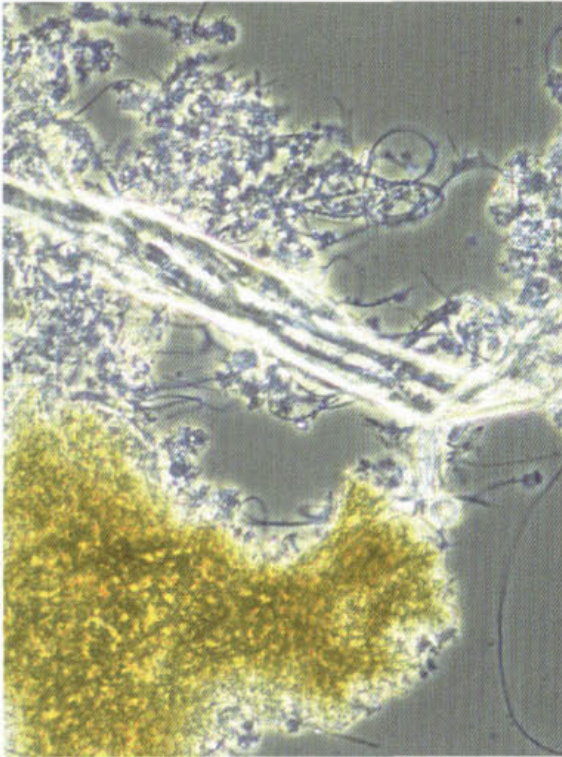
Figuur 22 Bio-P-kolonies in de vlok; niet gekleurd (300 x).



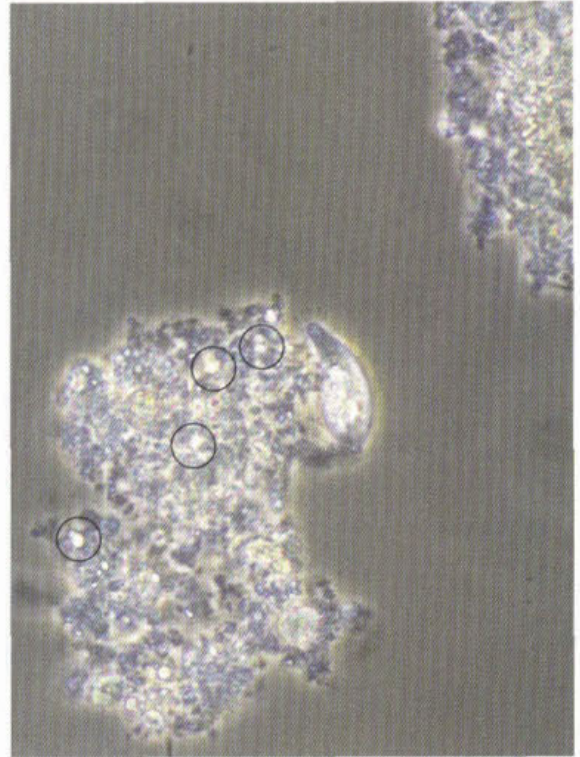
Figuur 23 Monokolonie van denitrificerende (?) bacteriën na Neisser kleuring (900 x).



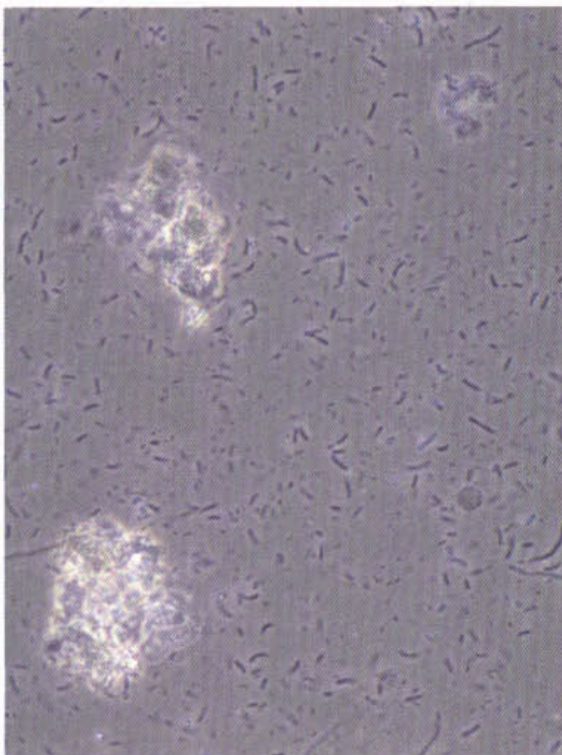
Figuur 24 Monokolonie van cellen met een dikke slijmmatrix (900 x).



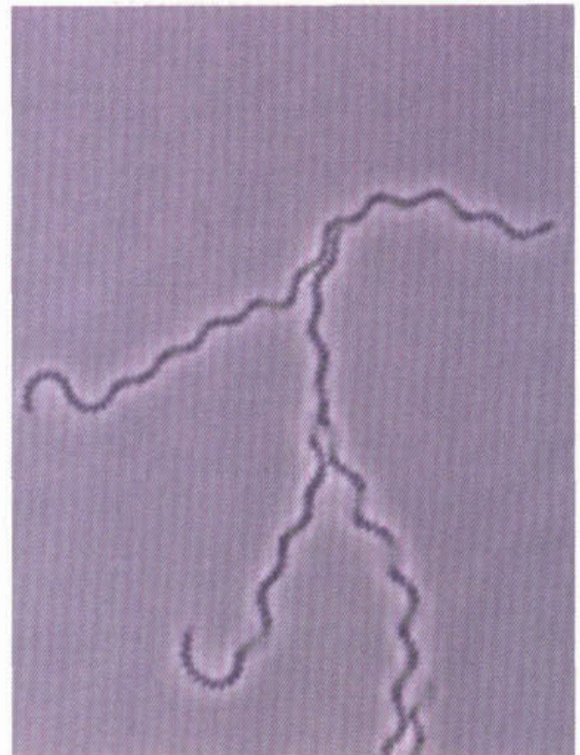
Figuur 25 Organische vezel in actiefslib (500 x).



Figuur 26 Zandkorreltjes in actiefslib (150 x).



Figuur 27 Veel losse cellen (300 x).



Figuur 28 Spirocheten (900 x).

4.3 Losse cellen, spirochetes en spirillen

Losse cellen

Onder 'losse cellen' worden de cellen verstaan die niet aan de vlok zijn gebonden en dus vrij in de waterfase aanwezig zijn (figuur 27). Ze bezinken niet in de nabezinktank. Losse cellen leiden daarom tot een verslechtering van de effluentkwaliteit.

Voor het registreren van het aantal losse cellen wordt een schaal variërend van 0 (= afwezig) tot 3 (= honderden cellen/beeldveld) gebruikt.

Zowel aanvoer met het influent als afslag van de vlokken zijn bronnen van losse cellen. Bij niet te hoge slibbelastingen worden de losse cellen vergaand verwijderd door in het slib aanwezige predatoren (o.a. ciliaten). Deze zijn dus onmisbaar voor een helder effluent.

Bij het stijgen van de belasting neemt het aantal 'beschikbare' losse cellen toe (meer aanvoer en een minder stevige vlok), waardoor ook de predatorenpopulatie groter wordt. Bij korte slibleeftijden, c.q. hoge slibbelastingen kunnen predatoren zich echter niet meer handhaven, omdat ze lang niet zo snel groeien als veel bacteriesoorten. De grens ligt bij een slibbelasting van 0,3 à 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag. Daarboven zijn nauwelijks predatoren en dus veel losse cellen aanwezig in het slib. De aanwezigheid van veel losse cellen bij lage slibbelastingen duidt op zuurstofgebrek of op de aanwezigheid van toxische componenten in het influent.

Spirochetes

Spirochetes zijn extreem flexibele bacteriën die op een zeer karakteristieke manier langzaam door het water 'kronkelen'. De cel vormt een dubbele spiraal met een korte en een lange winding (figuur 28). De cellen hebben meestal een diameter van circa 0,5 µm en een lengte van 20 à 30 µm. Voor het registreren van het aantal spirochetes wordt een schaal variërend van 0 (= afwezig) tot 3 (= tientallen cellen/preparaat) gebruikt.

In laagbelaste actief-slibinstallaties komen spirochetes zeer algemeen voor; soms zijn wel tientallen cellen per beeldveld aanwezig. Hun aantal kan tijdens de uitvoering van microscopisch onderzoek nog toenemen, omdat spirochetes vaak in de vlokken 'verstopt' zijn. De spirochetes verdwijnen grotendeels als het monster slib enkele dagen in een koelkast wordt bewaard.

Spirochetes worden voornamelijk waargenomen in installaties met anoxische condities (denitrificatie) in het centrum van de vlok of in een apart gedeelte van de beluchtingstank.

Spirillen

Spirillen hebben gebogen cellen die vaak met grote snelheid door de vloeistof bewegen. Ze zwemmen in een rechte lijn, met een zeer karakteristieke 'kurken-trekkerachtige' beweging, die abrupt op kan houden. De diameter kan variëren van 0,2 tot 1,7 μm , hun lengte bedraagt maximaal 20-30 μm .

Voor het registreren van het aantal spirillen in actiefslib wordt een schaal variërend van 0 (= afwezigheid) tot 3 (= tientallen cellen/preparaat) gebruik.

De aanwezigheid van spirillen in een actiefslib duidt op zuurstofgebrek in de installatie.

4.4 Vloktypen

De grote invloed van de procesomstandigheden op de kenmerken van de vlokken heeft tot gevolg dat slibben uit vergelijkbare installaties ook sterk op elkaar lijken. Dit geldt ook voor de samenstelling van de populatie van protozoën en metazoën (paragraaf 6.3). Bij het microscopisch onderzoek moet daarom worden nagegaan of de vlokkenmerken karakteristiek zijn voor de betreffende installatie. Eventuele afwijkingen moeten uiteraard genoteerd worden.

In (Nederlandse) communale installaties past meer dan 90% van alle slibben binnen de volgende drie vloktypen.

Vloktype 1

Vloktype 1 is karakteristiek voor installaties met een slibbelasting < circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag en oppervlaktebeluchters voor de zuurstofvoorziening. Deze groep omvat dus o.a. de oxydatiesloten en de carroussels.

Als draadvormende bacteriën grotendeels ontbreken, hebben de vlokken de volgende kenmerken:

- middelgroot (25-250 μm);
- stevig ($\rightarrow$ weinig losse cellen);
- afgerond tot hoekig;
- niet echt compact. Het is vaak duidelijk te zien dat de vlok in feite uit aparte, compacte 'subvlokjes' bestaat.

De aanwezigheid van draadvormende bacteriën, met name van *M. parvicella*, gaat gepaard met de vorming agglomeraten (figuur 16), waardoor de gemiddelde vlog-grootte toeneemt. De ontwikkeling van *M. parvicella* vertoont een uitgesproken seizoenspatroon met het minimum in de zomer en het maximum aan het einde van de winter. Dit betekent dat bij vloktype 1 vaak een zomer- en een winterbeeld kunnen worden onderscheiden.

Overigens kan worden opgemerkt dat het dichtgroeien van de agglomeraten betekent dat de vlokvormende bacteriën weer aan de winnende hand zijn.

Het toepassen van biologische nutriëntenverwijdering gaat, vooral 's-zomers, gepaard met een toename van het aantal monokolonies. Waarschijnlijk ten gevolge van de lange zuurstofloze perioden, neemt het aantal losse bacteriecellen vaak ook toe.

Het toepassen van ijzerzouten voor chemische defosfotering gaat gepaard met een bruinere kleur van de vlokken. Het doseren van aluminiumzouten voor dit doel leidt tot een afname van de gemiddelde vlogkgrötte.

Vloktype 2

Vloktype 2 is karakteristiek voor installaties met een slibbelasting < circa 0,2 BZV/kg d.s.-dag en bellenbeluchting voor de zuurstofvoorziening. De vlokken hebben de volgende kenmerken:

- (middel)groot; range: 25-1000 µm, vaak > 500 µm;
- stevig (→ weinig losse cellen);
- afgerond;
- compact;
- soms met een wat rafelige rand.

Door de geringere turbulentie in het water zijn de vlokken gemiddeld dus groter en ook compacter dan bij vloktype 1. Dit verschil leidt ook tot een donkerder kleur van de vlokken bij type 2.

Draadvormende bacteriën beïnvloeden de morfologie van de vlokken in het algemeen nauwelijks. Ze groeien veelal aan de rand van de vlokken of in de waterfase tussen de vlokken. Alleen als draden met veel aangroei aanwezig zijn (b.v. Type 0041), kunnen meer onregelmatig gevormde vlokken ontstaan.

Voor de effecten van (biologische) nutriëntenverwijdering wordt verwezen naar vloktype 1.

Vloktype 3

Vloktype 3 is karakteristiek voor installaties met een slibbelasting > 0,2 à 0,3 kg BZV/kg d.s.-dag. De vlokken zijn niet erg stevig waardoor vaak veel losse cellen aanwezig zijn. Bij korte slibleeftijden kunnen de belangrijkste, bacteriënconsumerende protozoën (de ciliaten) zich niet meer in de installatie handhaven, omdat ze niet snel genoeg groeien. Ook dit draagt in sterke mate bij aan de toename van het aantal losse cellen.

Er kunnen monokolonies aanwezig zijn, met name de zo karakteristieke Zoogloea kolonies.

De grootte en de vorm van de vlokken worden bepaald door de aard van het beluchtingssysteem. In installaties met bellenbeluchting zijn de vlokken vaak groot, maar onregelmatig gevormd. Met oppervlakbeluchters zijn de vlokken kleiner en meer afgerond. De vlokken hebben vaak een open structuur, zelfs als draadvormers ontbreken.

Bij het microscopisch onderzoek wordt nagegaan welke vloktype aanwezig is. Het nummer wordt op het analyseformulier genoteerd. Het nummer wordt gecombineerd met een 4 (b.v. 1-4) als het percentage kleine vlokjes groter is dan 20 à 30%. Andere afwijkingen worden onder 'opmerkingen' vermeld.

Industriële installaties

Slibben uit industriële installaties vertonen vaak grote onderlinge verschillen en kunnen niet in een beperkt aantal groepen ingedeeld worden. Er wordt daarom volstaan met de volgende opmerkingen:

1. Bij diverse industriële branches (met name bij 'chemisch' afvalwater) is de vlok niet echt stevig en gaat het toepassen van oppervlaktebeluchters veelal gepaard met veel kleine vlokken en vlokfragmenten. Het slib ziet er vaak wat 'rommelig' uit.
2. Een massale groei van draadvormende bacteriën, hetgeen o.a. bij de agro-industrie nog frequent optreedt, leidt vaak tot het ontstaan van grote, maar uitgesproken onregelmatig gevormde vlokken. De vlokken zijn hierbij vaak opgebouwd rond bundels van draden.
3. In feite moet voor iedere industriële installatie de 'normale' vlokkwaliteit worden vastgesteld. Dit moet dan gebeuren op basis van de criteria:
 - vorm
 - structuur
 - stevigheid
 - grootte
 - eventuele andere kenmerken

De aldus vastgestelde vlokkwaliteit kan vervolgens als referentie gebruikt worden bij het routinematig controleren van het actiefslib.

5 Draadvormende micro-organismen

Draadvormende micro-organismen zijn bacteriën, schimmels en algen waarvan de cellen elkaar niet loslaten na de celdeling. Op deze manier ontstaan draden die uit een aantal cellen bestaan. Soms kunnen de cellen elkaar ook niet loslaten, omdat ze door een schede (een soort huls) omgeven zijn. Tussen de cellen in een draad zijn altijd dwarswandjes of septa aanwezig. Deze septa zijn met lichtmicroscopie echter niet altijd duidelijk zichtbaar.

Het groeien in de vorm van een draad is karakteristiek voor bepaalde bacteriegeslachten. Deze bacteriën vormen dus onder praktisch alle omstandigheden draden. De veronderstelling, die wel eens geopperd is, dat de meeste draadvormende bacteriën onder andere omstandigheden losse cellen vormen - het groeien in de vorm van een draad zou een abnormaliteit zijn - is dus onjuist.

In actiefslib zijn ruim 30 verschillende soorten draadvormers waargenomen, voornamelijk bacteriën. Van deze 30 wordt een tiental frequent aangetroffen. Naar verwachting zijn in industriële installaties nog onbekende soorten aanwezig; de inventarisatie is dus nog niet compleet. De meeste draadvormers hebben geen naam maar een nummer, omdat hun eigenschappen nog niet (volledig) bekend zijn.

Voor de meer gangbare soorten is een determinatieschema ontwikkeld, waarmee de identiteit op een relatief eenvoudige manier kan worden vastgesteld.

Draadvormers zijn normale micro-organismen die vrijwel altijd in actiefslib aanwezig zijn en ook bijdragen aan het zuiveringsproces. Ze kunnen zowel vrij in de vloeistof als vlokgebonden aanwezig zijn.

Een massale groei van draadvormende micro-organismen leidt tot de vorming van licht slib en een verslechtering van de bezinkings- en ontwateringseigenschappen van het slib. Sommige soorten zijn daarnaast tevens verantwoordelijk voor het ontstaan van drijfslagen.

5.1 De Filament-Index

De grootte van de populatie van draadvormende micro-organismen kan sterk variëren. Voor het beheer van het proces is het nodig dat de populatiegrootte op enigerlei wijze gekwantificeerd kan worden. Het is in beginsel mogelijk om het aantal en de lengte van de draden in een bepaald slib door middel van tellen en meten vrij exact te bepalen. Dit is echter niet alleen een uiterst tijdrovende bezigheid, maar ook alleen uitvoerbaar als het betrekkelijk rechte draden betreft. Sterk gebogen draden, die vaak kluwens vormen en dwars door de vlok heenlopen, kunnen op deze manier niet worden gemeten. Ook voor diverse andere, in de literatuur vermelde kwantificeringsmethoden geldt dat ze, in vergelijking met de bepaling van de Filament-Index (FI), te arbeidsintensief zijn voor het meer routinematig onderzoek van actiefslib.

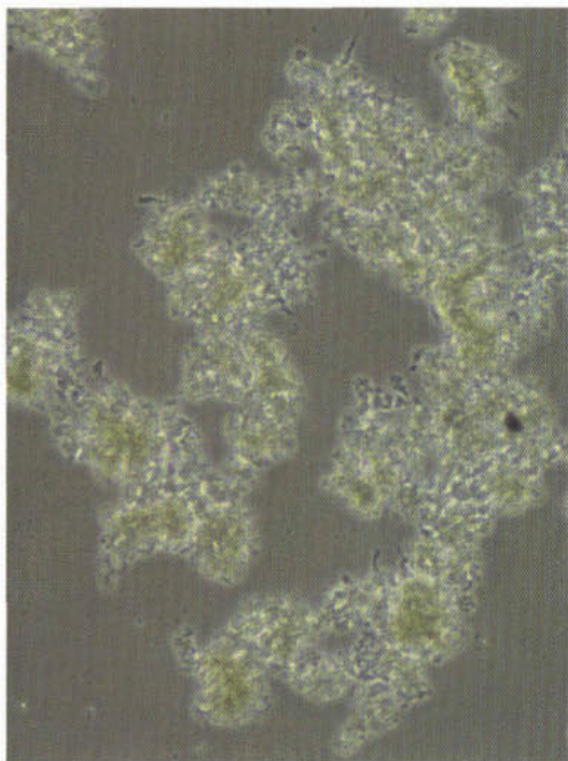
De Filament-Index is een maat voor het aantal draadvormende micro-organismen in actiefslib. Er wordt een schaal van 0 tot 5 toegepast (geen - zeer veel draadvormers). Er is ongeveer een factor 10 verschil in het aantal draden tussen opeenvolgende FI-klassen. De FI wordt bepaald door het microscopisch beeld van het slib bij een lage vergroting te vergelijken met een serie referentiefoto's van de verschillende FI-klassen (figuren 29-38). Het slib krijgt de FI-waarde van de foto die het beste met het aantal draden in het microscopisch beeld correspondeert.

Bij de FI-bepaling wordt het aantal draden dus visueel gekwantificeerd. Dit lijkt weinig exact, maar de praktijk heeft uitgewezen dat deze methode niet alleen snel uitvoerbaar is, maar ook zeer relevante informatie oplevert. Bij een FI van 1 of 2 is het effect van de draden op de bezinksnelheid van het slib nog gering. Bij een FI = 3 verslechteren de bezinkeigenschappen vaak merkbaar, vooral als forse draden aanwezig zijn. Bij hogere FI-waarden is meestal sprake van licht slib.

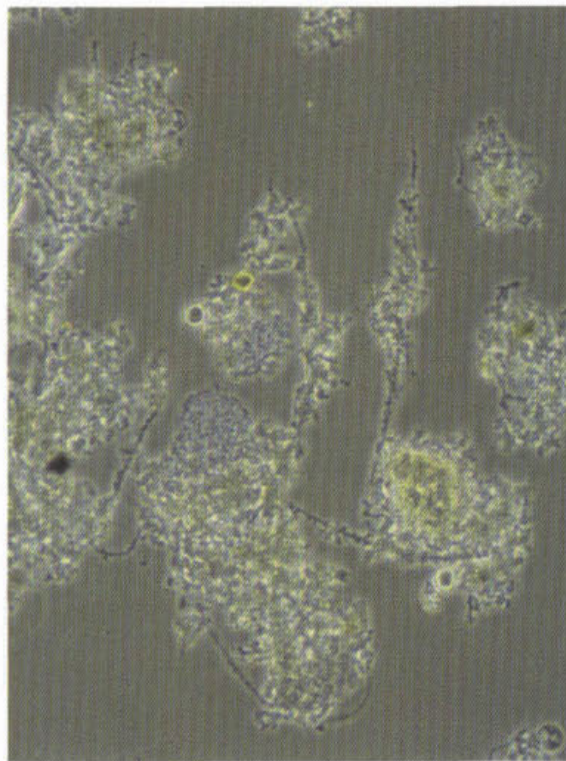
De bezinksnelheid van de vlokken wordt echter niet alleen door het aantal draden bepaald, maar ook door het soort draden, de asrest van het slib, enz. (zie hoofdstuk 10). Het verband tussen FI en SVI is daarom niet altijd consistent. Vooral als resultaten uit verschillende installaties worden samengevoegd, blijken er nogal wat uitzonderingen op dit verband te bestaan.

De volgende punten zijn tenslotte nog van belang bij de bepaling van de FI:

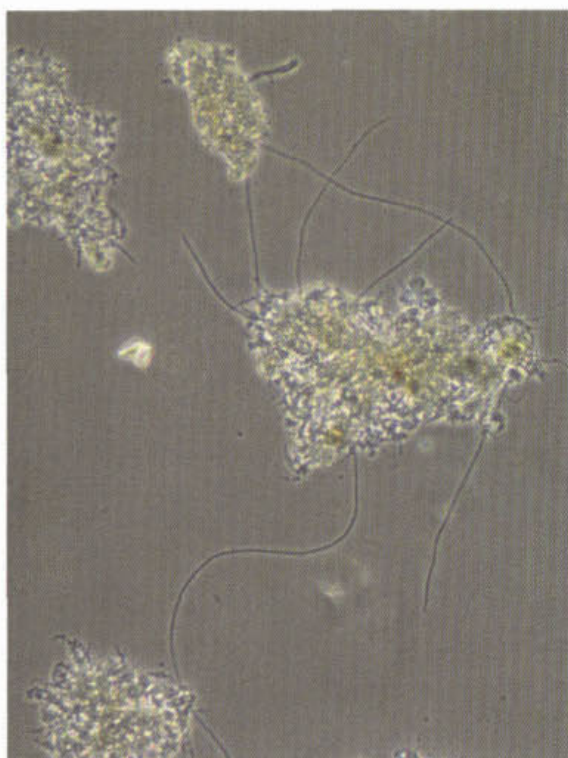
- het is een visuele schatting van het aantal draden. Dit betekent dat niet naar details wordt gekeken, de screening van het preparaat moet dus snel worden uitgevoerd;
- het verschil tussen b.v. 3⁺ en 4⁺ is klein. De keuze van een bepaalde FI is dus wel eens arbitrair. Er kan echter ook 3,5 op het analyseformulier ingevuld worden;
- bij twijfel wordt naar boven afgerond als het preparaat weinig vlokken bevat en naar beneden als veel vlokken aanwezig zijn;
- bij een ongelijke distributie van de draden in het preparaat wordt op het oog gemiddeld;
- de FI-indeling wordt in eerste instantie gebaseerd op de waarnemingen bij een vergroting van 100-200 x. Soms blijkt het echter nodig om deze indeling te herzien indien het slib bij een hogere vergroting bekeken wordt. Dit is een gevolg van het feit dat dunne draden soms over het hoofd gezien worden bij lage vergrotingen;
- draden die in de vlok verstopt zijn, worden met fase-contrast niet goed gezien en dus ook niet meegerekend bij het vaststellen van de FI. Het effect van deze draden op de bezinksnelheid van de vlokken is beperkt (alleen indirect via het beïnvloeden van de vlokstructuur). Na Gram kleuring zijn deze draden echter wel goed zichtbaar, waardoor soms veel meer draden aanwezig blijken te zijn dan eerst was vastgesteld.



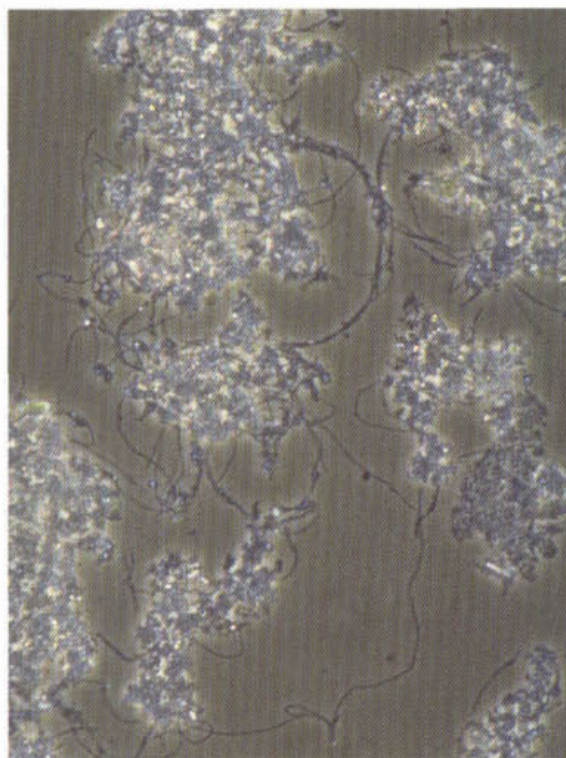
Figuur 29 $FI = 0$ (150 x).



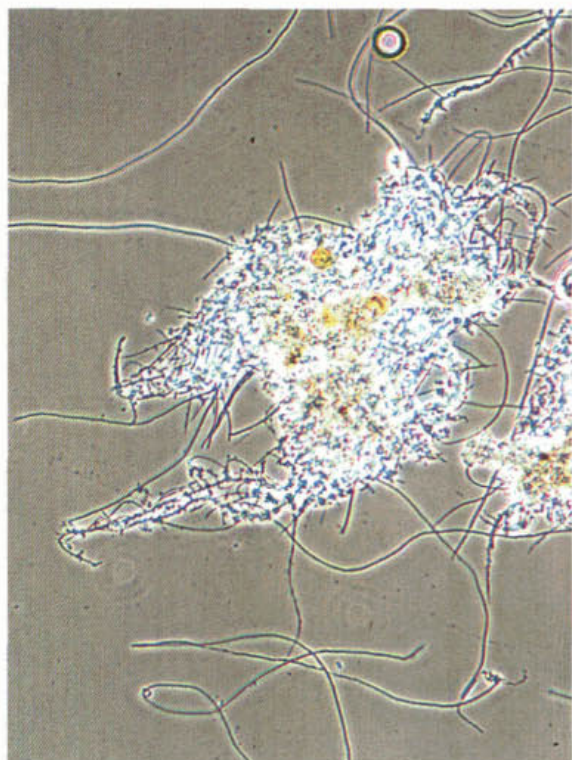
Figuur 30 $FI = 1$ (150 x).



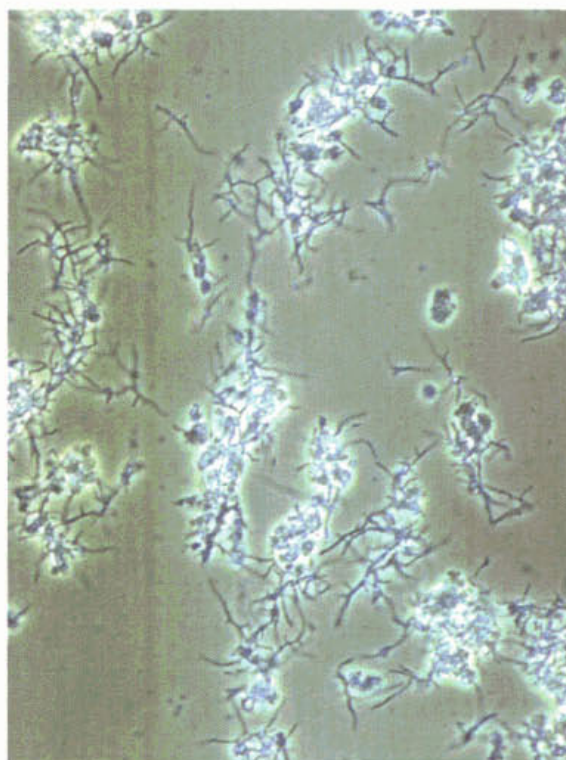
Figuur 31 $FI = 2$; forse draden (150 x).



Figuur 32 $FI = 2$; dunne draden (300 x).



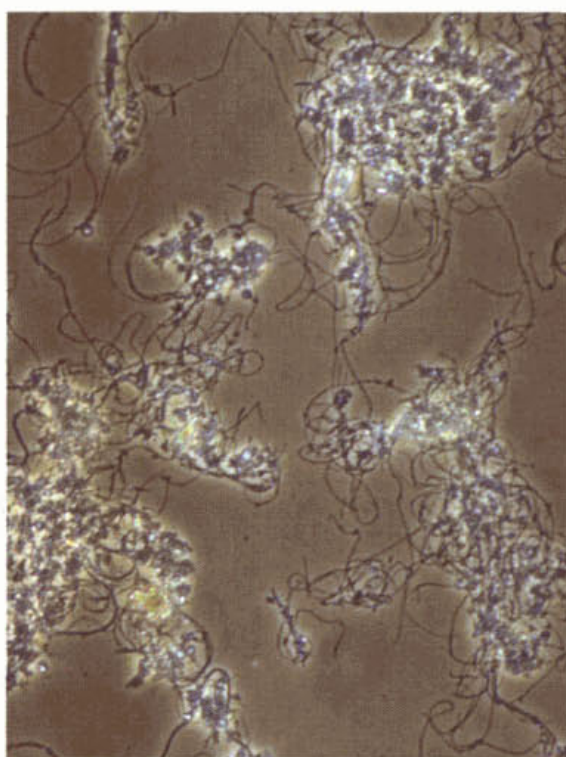
Figuur 33 $FI = 3$; forse draden (150 x).



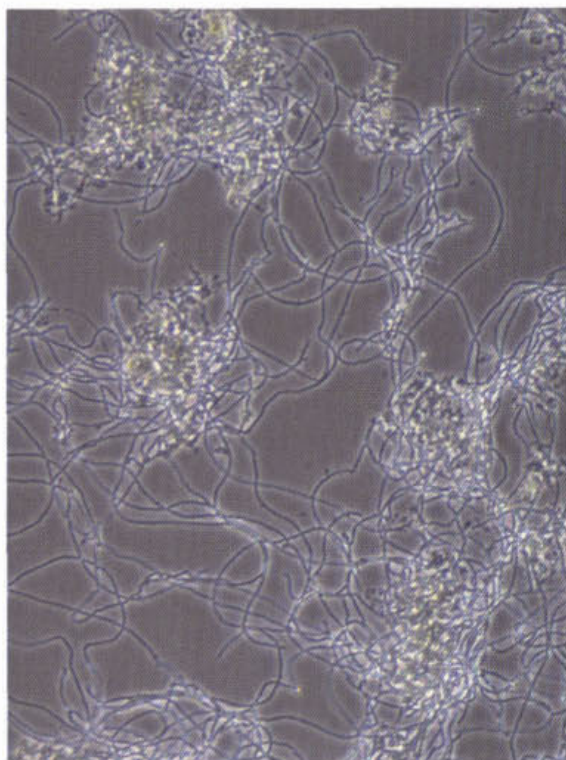
Figuur 34 $FI = 3$; dunne draden (300 x).



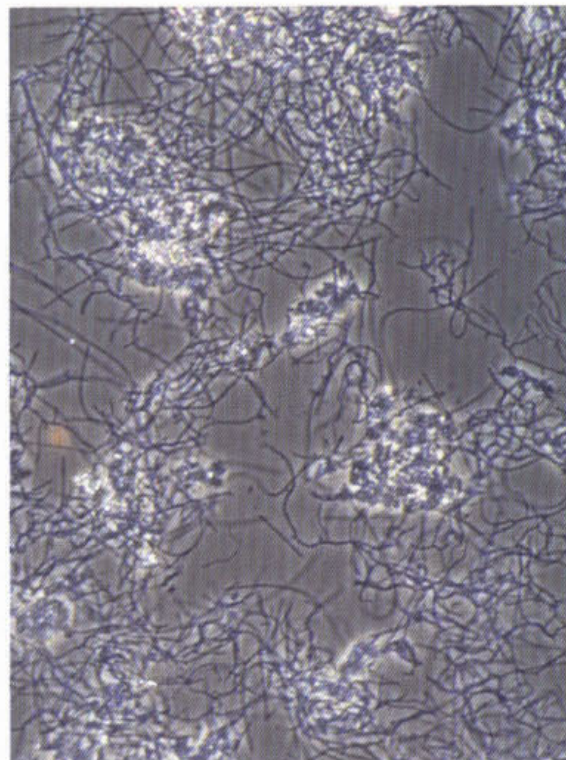
Figuur 35 $FI = 4$; forse draden (150 x).



Figuur 36 $FI = 4$; dunne draden (300 x).



Figuur 37 $FI = 5$; forse draden (150 x).



Figuur 38 $FI = 5$; dunne draden (300 x).

5.2 Determineren van draadvormende micro-organismen

Zoals in hoofdstuk 8 zal worden besproken, heeft de actief-slibpopulatie een dynamisch karakter. Dit betekent dat de grootte en de samenstelling van de populatie van draadvormende micro-organismen kan variëren, naar gelang de procesomstandigheden veranderen. Voor procesbeheer is het om drie redenen van belang te weten welke draadvormende micro-organismen aanwezig zijn:

- de aard en de omvang van problemen met de processtabiliteit zijn afhankelijk van het soort draadvormer dat aanwezig is.
De ontwikkeling van 'beruchte' soorten moet dus tijdig vastgesteld worden;
- er bestaat geen universele licht-slibbestrijdingsmethode. Voor het gericht bestrijden van draadvormende micro-organismen moet eerst worden vastgesteld welke soort aanwezig is;
- de aanwezigheid van bepaalde soorten zegt iets over de procesomstandigheden. Deze kunnen daarom als indikatororganismen gebruikt worden.

In de volgende paragrafen wordt aangegeven op welke manier draadvormende micro-organismen 'direct in actiefslib' geïdentificeerd kunnen worden.

5.2.1 Determinatiekenmerken

Voor het identificeren van draadvormende micro-organismen moeten 11 kenmerken worden bepaald. Een aantal van deze kenmerken is in de figuren 39 en 40 geïllustreerd

Beweeglijkheid

Slechts enkele draadvormende bacteriën (*Beggiatoa* en *Flexibacter*) zijn in staat zich te verplaatsen. Dit gebeurt door middel van een beweging die bekend staat als 'gliding movement'. Het lijkt op de manier waarop een worm zich voortbeweegt. Indien men denkt dat een bepaalde draadvormer beweegt, moet wel geverifieerd worden dat geen sprake is van vloeistofstromingen in het preparaat, ten gevolge van verdamping van het water langs de randen.

Vertakkingen

Het al dan niet aanwezig zijn van vertakkingen is een belangrijk kenmerk bij het determineren van draadvormende bacteriën in actiefslib. Er worden **echte** en **valse** vertakkingen onderscheiden.

Actinomyceten en schimmels vormen **echte** vertakkingen. Hierbij ontspruit de zijtak daadwerkelijk uit de hoofdtak. De cel bij de vertakking is in feite in 2 richtingen uitgegroeid.

Schedevormende bacteriën, vooral *Sphaerotilus natans* en Type 1701, vormen **valse** vertakkingen. Deze ontstaan doordat zogenaamde zwermcellen zich op de schede van een al aanwezige draad vastzetten en vervolgens, via celdeling, uitgroeien tot zijtakken (incl. schede).

Zwermcellen zijn cellen die zich van het uiteinde van de draad hebben afgesplitst en tijdelijk, zolang ze zich nog niet gehecht hebben, als losse cellen in het slib aanwezig zijn. Ook bij een beschadiging van de schede kan ter plekke een zijtak gevormd worden.

Bij valse vertakkingen is vaak een minieme ruimte zichtbaar tussen de cellen in de hoofdtak en die in de zijtak, deze ruimte ontbreekt bij echte vertakkingen. Valse vertakkingen zijn altijd V-vormig, terwijl bij echte vertakkingen de zijtakken vaak 'loodrecht' op de hoofdtak staan (echter niet bij de actinomyceet *Skermania pini-formis*). Actinomyceten vormen altijd talrijke echte vertakkingen; een aantal vertakte draden bij elkaar doet daarom sterk aan een takkenbos denken. Draadvormers met valse vertakkingen vormen deze veel minder frequent. Schimmels zijn op grond van hun veel forsere draden gemakkelijk van de schedevormers en de actinomyceten te onderscheiden.

Hechting van ééncellige bacteriën aan een draad (= aangroei) wordt soms voor vertakkingen aangezien.

Incidenteel worden in slib draden waargenomen die aan de basis met elkaar zijn verbonden. Dit heet een roset van draden. Eén en ander is een gevolg van het feit dat deze bacteriën aan de basis van de filamenten stoffen uitscheiden waarmee ze zich vast kunnen zetten. Vooral *Thiothrix* soorten kunnen rosetten vormen.

Vorm van de draden

Bij de vorm van de draden worden drie groepen onderscheiden:

- 'recht'
- gebogen
- kronkelig

Recht is tussen aanhalingstekens geplaatst, omdat alleen *Haliscomenobacter hydrossis* echt kaarsrechte draden vormt. Vooral bij relatief lange draden zijn rechte exemplaren in feite nog wel enigszins gebogen.

Bij het microscopisch onderzoek moet onderscheid worden gemaakt tussen (1) recht tot enigszins gebogen en (2) gebogen tot kronkelig.

Aangroei

Het oppervlak (= de buitenwand) van draadvormende micro-organismen is meestal 'schoon'. Soms zijn echter andere cellen of vlokdeeltjes aan het oppervlak gehecht, waardoor dit (gedeeltelijk) is bedekt. Dit heet 'aangroei van de draden'. De draden van bacteriën met een schede om de cellen zijn vaak door aangroei omgeven.

Bij het determineren van draadvormers moet onderscheid worden gemaakt tussen (1) weinig/geen aangroei en (2) veel aangroei.

Diameter van de draden

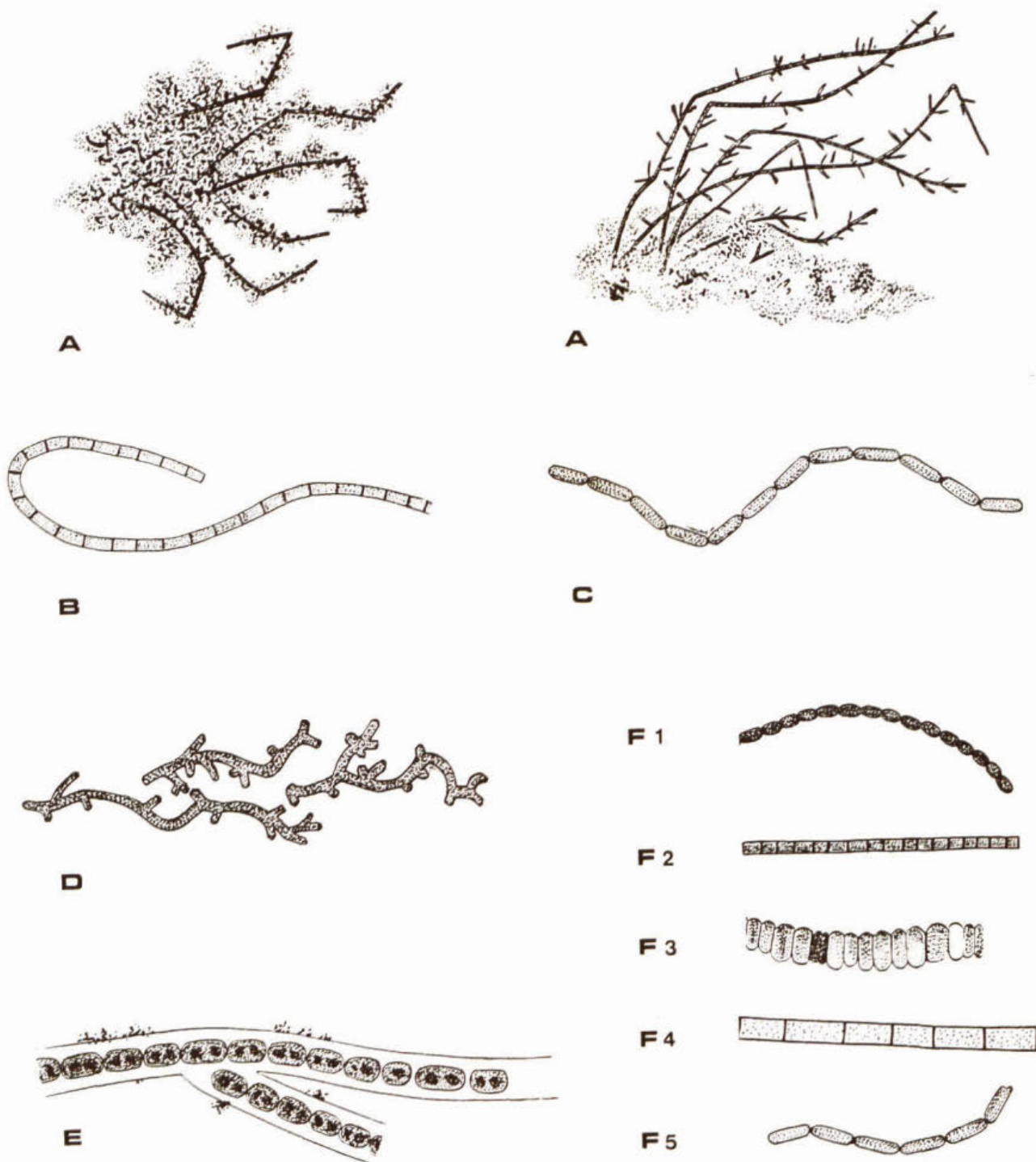
Draadvormende micro-organismen worden op basis van hun diameter in drie groepen verdeeld:

- diameter $< 1 \mu\text{m}$
- diameter 1-2.5 μm
- diameter $> 2.5 \mu\text{m}$

Bij sommige draadvormers (Type 021N en *Thiothrix* soorten) kan de celdiameter naar het uiteinde van de draad geleidelijk afnemen.

Septa of dwarswanden

Dwarswanden of septa zijn de celwanden tussen de in een draadvormer aan elkaar grenzende cellen. De septa zijn lang niet altijd duidelijk zichtbaar met lichtmicroscopie. Bij het determineren van draadvormende organismen moet onderscheid worden gemaakt tussen (1) duidelijk zichtbaar en (2) niet/slecht zichtbaar. Bij draden met veel aangroei moet op het schone uiteinde worden gelet.



Figuur 39 Diverse morfologische kenmerken

A: Aangroei van de draden

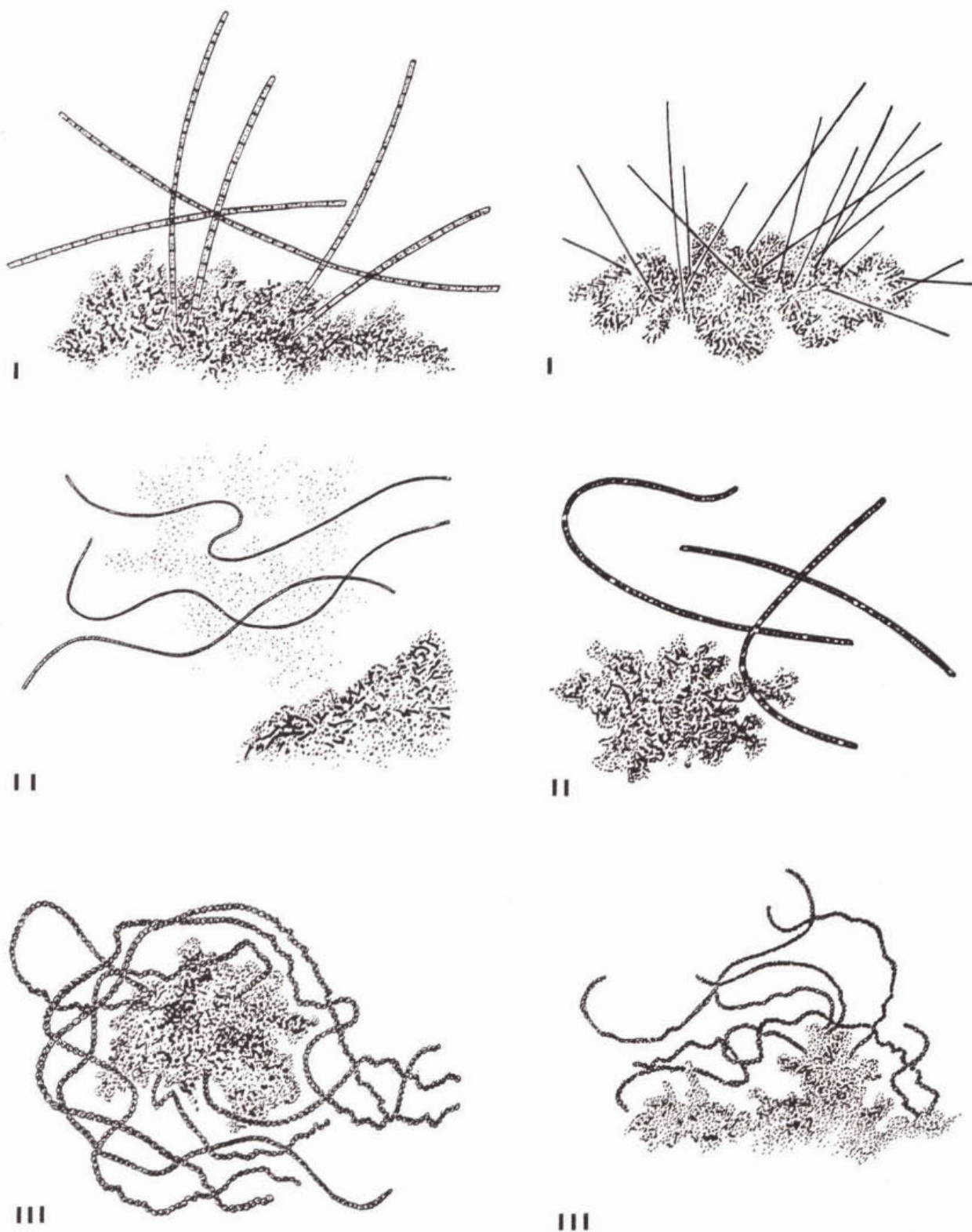
B: Geen insnoeringen van de buitenwand

C: Duidelijke insnoeringen aanwezig

D: Echte vertakkingen

E: Valse vertakking; de cellen zijn omgeven door een schede

F: Celvormen; (1) bijna rond, (2) vierkant, (3) rechthoekig, (4) discus, (5) staafvormig.



Figuur 40 Vorm van de draden
 I: rechte filamenten
 II: gebogen filamenten
 III: kronkelige filamenten.

Celvorm

Bij losse bacteriecellen kunnen de volgende celvormen onderscheiden worden:

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

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

De celvorm kan uiteraard alleen worden vastgesteld als de septa duidelijk zichtbaar zijn. De lengte van de cellen in een bepaalde draad is vaak sterk variabel. Bij sommige soorten (o.a. Type 021N, *S. natans* en *Thiothrix*) kan de cellengte naar het uiteinde van de draad sterk toenemen.

Schede

Bij bepaalde soorten draadvormers zijn de cellen omgeven door een transparante huls. Dit wordt een schede genoemd. Met lichtmicroscopie is zo'n schede vaak niet te zien. Bij sommige soorten is de schede na de Gram kleuring wel zichtbaar. De schede wordt soms ook beter zichtbaar als het slibmonster enkele dagen in een koelkast wordt bewaard. Op de schede is vaak veel aangroei aanwezig.

Overigens moet worden opgemerkt dat lege cellen in een draad soms voor een schede kunnen worden aangezien. Bij lege cellen is het transparante gedeelte echter altijd heel kort. Dit betekent dat in of aan het uiteinde van de draden lange, transparante hulzen zichtbaar moeten zijn, alvorens definitief geconcludeerd kan worden dat een schede aanwezig is. Omdat dit kenmerk vaak niet goed vastgesteld kan worden, is het van ondergeschikt belang bij het determineren van draadvormende bacteriën in actiefslib.

Granulen

Granulen zijn bolletjes reservestoffen in de cellen. Bij het microscopisch onderzoek worden drie soorten granulen onderscheiden (zie ook de paragrafen 2.6.2 en 2.7):

- polyfosfaatgranulen. Deze zijn zonder Neisser kleuring meestal niet of slecht te zien;
- zwavelgranulen. Deze bolletjes zijn donker getint zolang ze nog klein zijn, de grotere exemplaren zijn daarentegen sterk lichtbrekend en daardoor duidelijk zichtbaar;

- andere reservestoffen. Dit betreft meestal poly-b-hydroxybutyraat (PHB). In communale installaties wordt dit overigens visueel nooit waargenomen. De PHB-granulen zijn ook sterk lichtbrekend, net als de zwavelbolletjes. De laatstgenoemde hebben een blauwgele glans, de PHB-granulen zijn geler. Het kleurverschil is niet zo makkelijk te zien. Door alcohol door het preparaat te laten stromen (druppel ethanol aan de ene kant en een filtreerpapiertje aan de andere kant) kan worden vastgesteld welke reservestof aanwezig is. De S-bolletjes verdwijnen (lossen op), de PHB-granulen blijven intact.

De resultaten van de kleuringen volgens Gram en Neisser

Voor de uitvoering van deze kleuringen wordt verwezen naar paragraaf 2.6.

5.2.2 De begrippen ‘dominerend’ en ‘secundair’

In een bepaald actiefslib zijn meestal verschillende draadvormende micro-organismen aanwezig. Hierdoor wordt het identificeren van deze draadvormers natuurlijk lastiger. Veelal is dit ‘probleem’ toch minder gecompliceerd dan het op het eerste gezicht lijkt, omdat de verschillende soorten meestal niet in gelijke aantallen aanwezig zijn. Er is eigenlijk altijd sprake van dominerende en secundaire soorten. Als een soort vuistregel geldt dat bepaalde soorten “secundair aanwezig” genoemd worden als hun aantal 10-20 maal zo klein is als dat van de dominerende soorten. Bij lage slibbelastingen zijn meestal 1-2 dominerende en een variabel aantal secundaire soorten aanwezig, bij slibbelastingen $> \text{ca. } 0,1 \text{ kg BZV/kg d.s.} \cdot \text{dag}$ kan het aantal dominerende soorten toenemen.

Het onderscheid dominerend/secundair staat overigens los van de FI-indeling. Bij iedere FI moet dus onderscheid gemaakt worden tussen dominerende en secundaire soorten. Alleen bij lage FI-waarden (1 of 2) komt het soms voor dat een duidelijk dominerende draadvormer ontbreekt.

5.2.3 Werkwijze bij het determineren

Het determineren omvat enkele stappen, waaronder het bekijken van de gekleurde preparaten.

Afhankelijk van de conditie van de draden, kunnen kenmerken als vorm van de cellen of dikte van de draden wel enigszins variëren. Het is daarom belangrijk dat altijd een aantal draden van een bepaald soort wordt bekeken alvorens de kenmerken genoteerd worden.

Voor minder ervaren microscopisten is het gelijktijdig determineren van alle aanwezige soorten niet zo eenvoudig. Dit leidt gemakkelijk tot vergissingen. Om de methode goed te leren, is het verstandig om de diverse soorten in het begin niet simultaan maar één voor één te determineren.

Bij een lage vergroting wordt eerst nagegaan hoeveel verschillende soorten draadvormers aanwezig lijken te zijn. Hierbij worden dominerende en secundaire soorten onderscheiden. De morfologische kenmerken van de draden worden genoteerd. Hiervoor kan het formulier worden gebruikt dat als Bijlage B in deze handleiding is opgenomen. Tevens wordt vastgelegd waar de draden aanwezig zijn, bijvoorbeeld los in de waterfase of aan de rand van de vlokken. Zowel de vorm als de plaats van de draden zijn hulpmiddelen om deze bij een sterke vergroting te kunnen terugvinden.

Vervolgens wordt overgeschakeld naar een vergroting van 400 en later naar 1000 maal. De soorten die bij de lage vergroting zijn waargenomen, worden weer opgezocht. De diverse kenmerken die nodig zijn voor de determinatie worden nu verzameld en genoteerd.

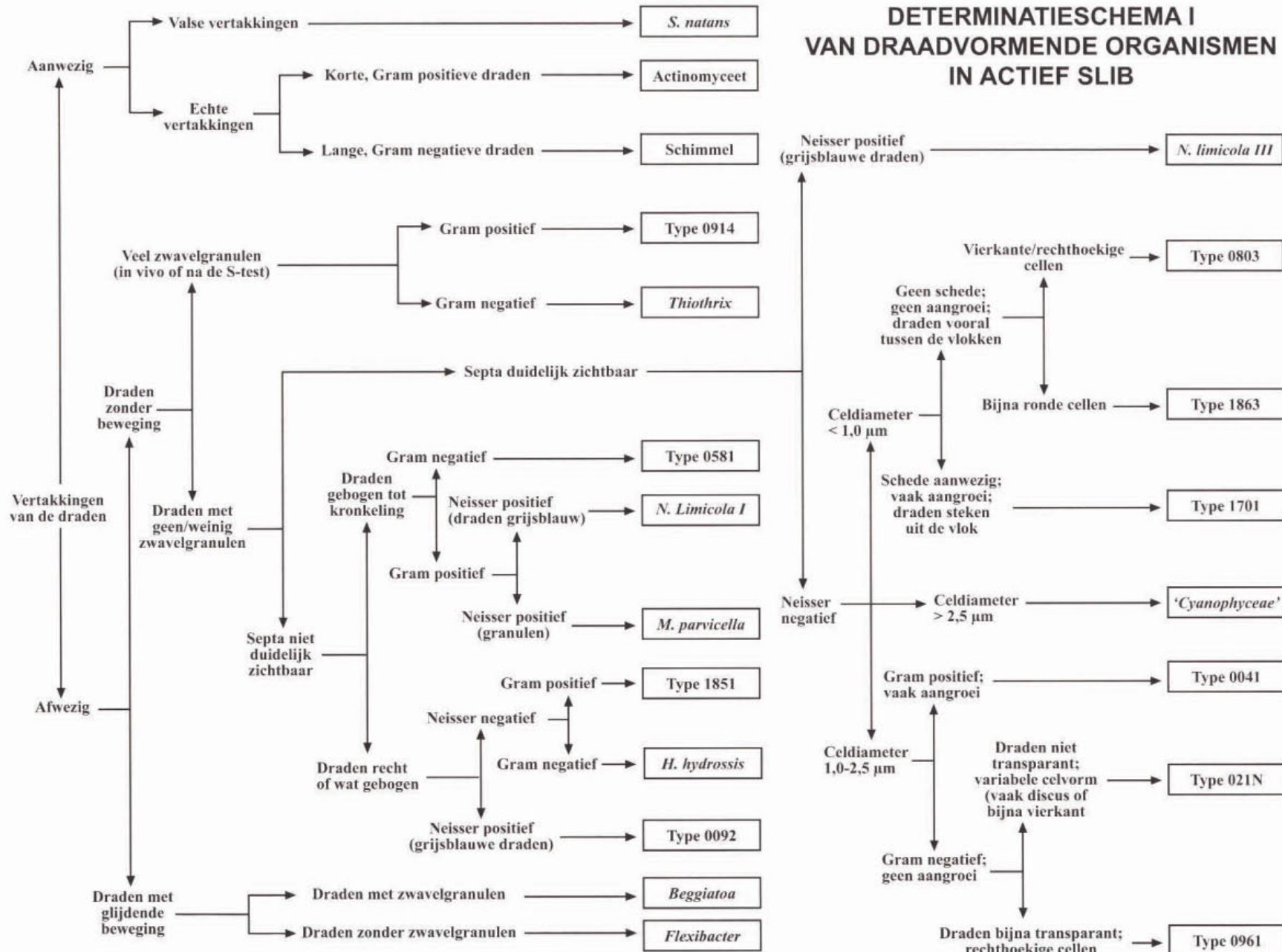
Aansluitend worden de gekleurde preparaten bekekend bij 1000x helderveld. Met name Neisser-negatieve draden zijn vaak moeilijk terug te vinden in het preparaat.

Met een volledige set data kan nu de identiteit worden bepaald. Hiervoor zijn twee determinatieschema's ontwikkeld. Deze zijn op de volgende pagina's weergegeven. In beide schema's zijn dezelfde 21 soorten draadvormers opgenomen. In het tweede schema vormen de resultaten van de kleuringen (Gram en Neisser) de hoofdentrees. Het is een kwestie van persoonlijke voorkeur welk schema geprefereerd wordt. Overigens is een aantal zeldzame soorten niet in de determinatieschema's opgenomen.

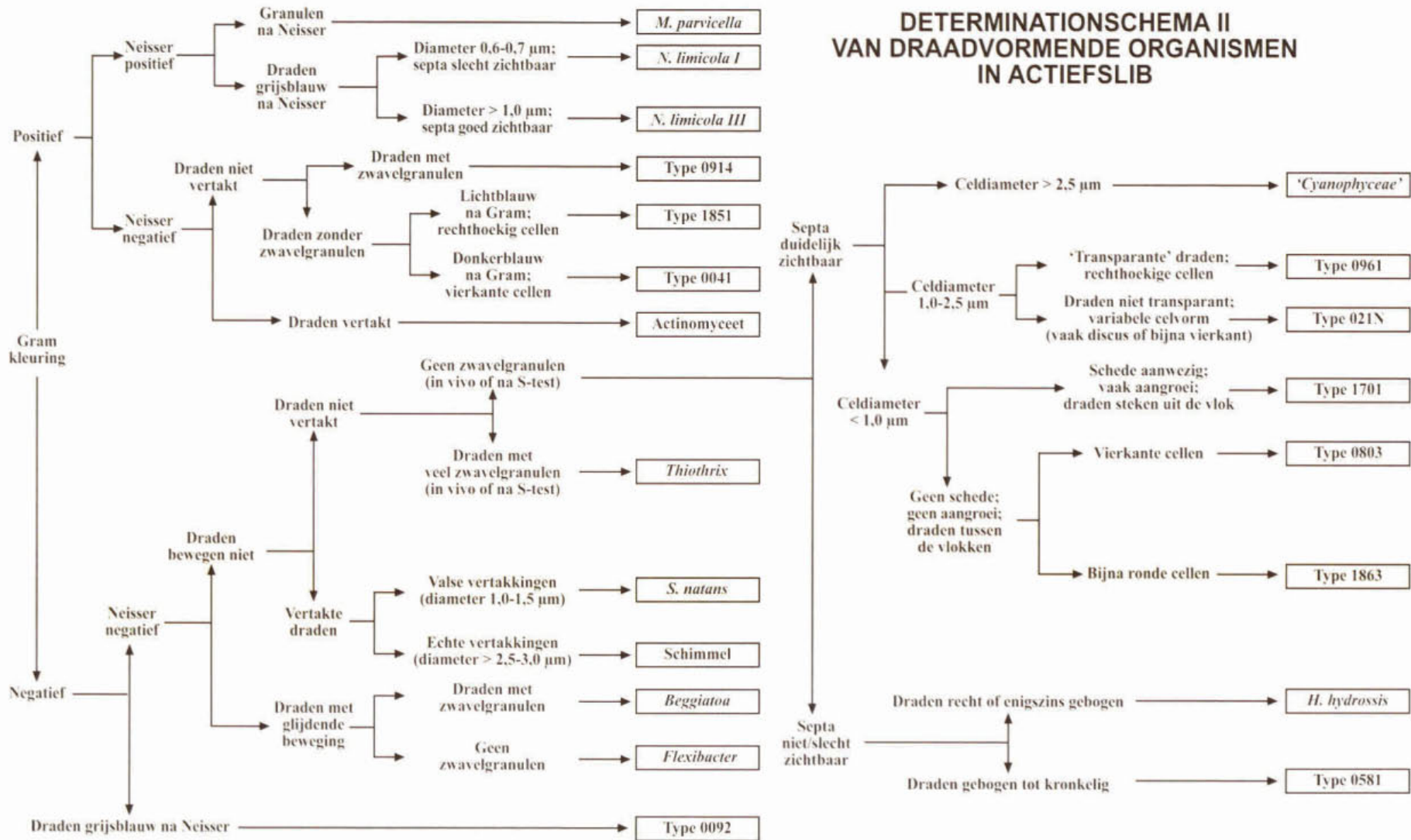
Zodra een naam of een nummer is vastgesteld, moet worden gecontroleerd of de conclusie correct is. De draden in het microscopisch beeld worden nu vergeleken met foto's van het betreffende organisme. Tevens moet geverifieerd worden of de genoteerde kenmerken grotendeels kloppen (zie paragraaf 5.3 en tabel 1). Bij duidelijke verschillen moeten de waarnemingen nog eens kritisch beoordeeld worden. Met name het al dan niet duidelijk zichtbaar zijn van de septa is een potentiële bron van vergissingen. De correcte instelling van de microscoop vormt een absolute voorwaarde om dit kenmerk goed te kunnen beoordelen. Soms kan een vergissing ook gecorrigeerd worden door het andere determinatieschema te volgen. Bij de beschrijving van de draadvormende micro-organismen is overigens aangegeven welke soorten gemakkelijk verwisseld kunnen worden.

Incidenteel, vooral bij industriële installaties, kunnen echter draadvormende micro-organismen in actiefslib aanwezig zijn die onbekend zijn of die niet in de determinatieschema's zijn opgenomen.

DETERMINATIESCHEMA I VAN DRAADVORMENDE ORGANISMEN IN ACTIEF SLIB



DETERMINATIONSCHEMA II VAN DRAADVORMENDE ORGANISMEN IN ACTIEFSLIB



Tabel 1 Overzicht van de kenmerken van de draadvormende micro-organismen die opgenomen zijn in het determinatieschema.

	FASE CONTRAST MICROSCOPIE													HELDERVELD					
	vertakkingen	beweeglijk	vorm draden		lengte draden < 200 µm	aangroei	schede aanwezig	septa duidelijk zichtbaar	diameter cellen			cellen vierkant of recht-hoekig	cellen rond, discus- of staaf-vormig	S-granulen in de cellen		Gram kleuring		Neisser kleuring	
			recht of enigszins gebogen	gebogen of kronkelig					< 1,0 µm	1,0 - 2,5 µm	> 2,5 µm			in vivo	na de S-test	positief	negatief	positief	negatief
Actinomyceten	+			+	+				+			∞	∞			+		±	+
Beggiatoa		+	+		±				+	+	+	∞	∞	+			+		+
'Cyanophyceae'			+				±	+			+	+	+			+	+		+
<i>H. hydrossis</i>			+		+		+		+			∞	∞				+		+
Flexibacter		+	+		+			±	+			∞	∞				+		+
<i>M. parvicella</i>				+	+				+			∞	∞			+		+ ⁶⁾	
<i>N. limicola I</i>				+	±			±	+				+			+		+ ⁷⁾	
<i>N. limicola III</i>				+	±			+	+	+			+			+	9)	+ ⁷⁾	9)
Schimmels	+		+					+		+	+	+				4)	4)		+
<i>S. natans</i>	+ ¹⁾		+			±	+	+		+			+				+		+
<i>Thiothrix</i>	2)		+		±		±	+ ³⁾	+	+		+ ³⁾	+ ³⁾	±	+		+		+
Type 0041			+		±	+	+	+	+	+		+				+			+
Type 0092			+		+				+			∞	∞				+	+ ⁷⁾	
Type 021 N	2)		+		±			+	±	+		+	+		± ⁸⁾		+		+
Type 0581				+	+				+			∞	∞				+		+
Type 0803			+		+			+	+			+				±	+		+
Type 0914			+		+			+ ³⁾	+			+ ³⁾		+		+			+
Type 0961			+					+		+		+					+		+
Type 1701			+		+	+	+	+	+				+				+		+
Type 1851			+		±	+	+		+			∞	∞					+ ⁵⁾	+
Type 1863				+	+			+	+				+				+		+

± = soms; ∞ = celvorm kan niet met behulp van fase-contrast waargenomen worden;

1) valse vertakkingen; 2) soms rosetten aanwezig; 3) cellen zichtbaar na oplossen van de zwavelbolletjes;

4) schimmels kunnen niet op deze manier gekleurd worden; 5) lichtblauw 6) bolletjes; 7) draden krijgen een

grijs-blauwe kleur; 8) kleine bolletjes; 9) er bestaan ook Gram en Neisser negatieve soorten

5.3 Beschrijving van de diverse soorten

In deze paragraaf worden 27 draadvormende organismen beschreven. Hierbij wordt tevens aangegeven onder welke procesomstandigheden de diverse soorten vooral voorkomen. Zoals zal blijken, is de kennis hierover nog niet compleet. Voor bestrijdingsopties wordt verwezen naar hoofdstuk 10. De volgorde van bespreking is alfabetisch, respectievelijk numeriek van de organismen die nog geen naam hebben.

5.3.1 Actinomyceten

Omschrijving

Actinomyceten (figuur 41) hebben de volgende kenmerken:

- echte vertakkingen frequent aanwezig;
- niet beweeglijk;
- 'kronkelige' draden (takkenbos), in en rond de vlokken;
- lengte draden $< 200 \mu\text{m}$;
- celdiameter $< 1,0 \mu\text{m}$ (vaak $0,5\text{-}0,7 \mu\text{m}$);
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa niet zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram positief;
- soms Neisser positief (poly -P-granulen).

De groep Actinomyceten omvat nogal wat verschillende soorten, die alleen via nader onderzoek van elkaar kunnen worden onderscheiden. Door de uiterst karakteristieke vertakkingen, is verwisseling met andere draadvormers vrijwel niet mogelijk. *M.parvicella* is verwant aan de Actinomyceten.

Voorkomen in actiefslib

Actinomyceten zijn beruchte 'drijfslaagvormers', vooral in landen waar de gemiddelde watertemperatuur hoger is dan in Nederland. Afvoer van geflooteerd materiaal naar de slibgisting kan ook in deze tank tot het ontstaan van een drijfslaag leiden. Het negatieve effect op de SVI is vaak beperkt. Actinomyceten floteren selectief, waardoor de populatie in de drijfslaag vaak veel groter is dan in het slib in suspensie. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor de groei van Actinomyceten:

- vetten of andere hydrofobe bestanddelen in het influent;
- oppervlakte-actieve stoffen in het influent;
- terugvoer van geflooteerd materiaal naar de influentkelder;
- watertemperatuur hoger dan circa 15°C .

De beschikbare kennis is nog onvolledig. Gram positieve bacteriën hebben veelal een hydrofoob celoppervlak waardoor vetten e.d. goed aan hun oppervlak binden en zo uit het water opgenomen kunnen worden. Vetten en oppervlakte-actieve stoffen zijn altijd in stedelijk afvalwater aanwezig. Desondanks zijn Actinomyceten, ook bij hogere watertemperaturen, lang niet altijd aanwezig. Dit kan ten dele uit de

slibbelasting verklaard worden: Actinomyceten worden vooral bij hogere slibbelastingen aangetroffen (0,1 -0,7 kg BZV/kg d.s.·dag). Bij lagere slibbelastingen zijn andere Gram-positieve draadvormers zoals *M.parvicella* aanwezig, die eveneens op de vetfractie uit het influent groeien. Er zijn uiteraard ook vlokvormers die dit substraat kunnen gebruiken. Het is nog niet bekend welke factoren beslissend zijn bij de competitie om dit substraat.

5.3.2 *Beggiatoa*

Omschrijving

Beggiatoa (figuur 42) heeft de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- beweeglijk (glijdende beweging);
- rechte/gebogen draden, los in het water tussen de vlokken;
- lengte draden variabel;
- diameter cellen 1,5 - 2,5 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa soms zichtbaar;
- rechthoekige cellen;
- in vivo zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

De combinatie van zwavelgranulen in de draden plus een glijdende beweging is dermate kenmerkend, dat verwisseling met andere soorten vrijwel is uitgesloten.

Voorkomen in actiefslib

Beggiatoa wordt aangetroffen in installaties met veel gereduceerde zwavelverbindingen in het influent (H₂S !) en/of een groot tekort aan zuurstof. De draden beïnvloeden de bezinksnelheid van de vlokken niet wezenlijk; *Beggiatoa* is veeleer een indikatororganisme.

5.3.3 'Cyanophyceae'

Omschrijving

De "Cyanophyceae" (figuur 43) omvatten een groep draadvormers met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden, los in het water tussen de vlokken;
- lengte draden > 200 µm;
- diameter cellen > 2,5 µm;
- geen aangroei;
- schede ???

- septa duidelijk zichtbaar, tenzij de draden veel reservestoffen bevatten. Deze reservestoffen verdwijnen vaak als het slib enkele dagen in een koelkast wordt bewaard;
- celvorm variabel;
- geen zwavelopslag;
- meestal Gram negatief;
- meestal Neisser negatief.

Draadvormers worden vooral op basis van hun celdiameter in deze groep ingedeeld. Het betreft draadvormende organismen met opvallend forse draden. De celvorm en de resultaten van de kleuringen kunnen sterk variëren, hetgeen betekent dat deze groep verschillende soorten omvat. De wat dunnere soorten kunnen met Type 021N verwisseld worden.

De aanhalingstekens bij de naam betekenen dat deze draadvormers morfologisch op Cyanophyceae (=blauwieren) lijken, maar qua stofwisselingsprocessen hiervan sterk verschillen: In plaats van zonne-energie (fotosynthese) gebruiken ze organische verbindingen voor hun groei.

Voorkomen in actiefslib

“Cyanophyceae” worden niet vaak in actiefslib waargenomen. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormers:

- slibbelastingen > circa 0,1 kg BZV/kg d.s.-dag;
- afvalwater met een hoog gehalte aan organische zuren zoals azijnzuur of propionzuur;
- volledige menging in de beluchtingsruimte;
- waarschijnlijk ook tekorten aan nutriënten.

Dit betekent dat deze draadvormers vrijwel niet voorkomen in communale installaties met nutriëntenverwijdering. In industriële installaties met veel organische zuren in het influent kunnen “Cyanophyceae” zich zeer massaal ontwikkelen, hetgeen tot hoge SVI-waarden zal leiden.

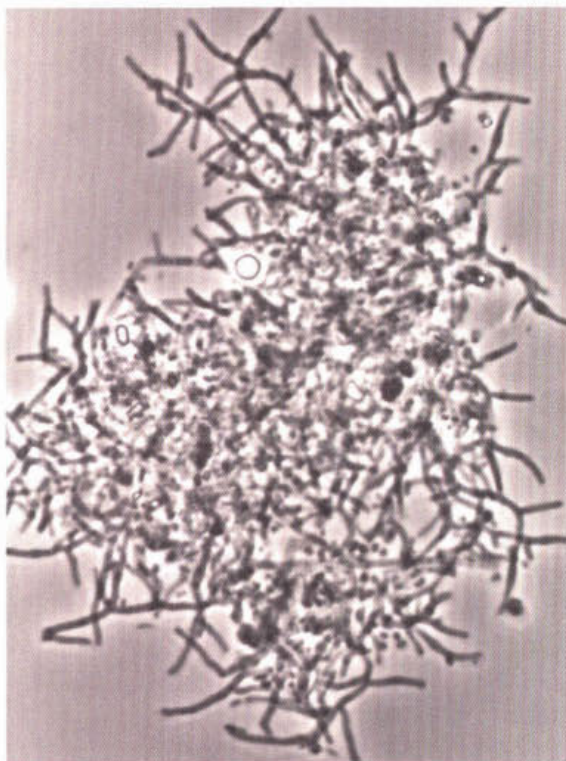
5.3.4 *Flexibacter*

Omschrijving

Flexibacter (figuur 44) heeft de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- glijdende beweging;
- gebogen draden, los in de vloeistof;
- lengte draden < 200 µm;
- diameter cellen ca. 0,7 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa niet duidelijk zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Door de glijdende beweging en het ontbreken van zwavelgranulen is verwisseling met andere soorten vrijwel uitgesloten.



Figuur 41 Slibvlokje met Actinomyceten (900 x).



Figuur 42 Beggiatoa (900 x).



Figuur 43 Voorbeeld van 'Cyanophyceae' (1150 x).



Figuur 44 Flexibacter (A) en Type 021N (B) (900 x).

Voorkomen in actiefslib

Flexibacter draden worden incidenteel waargenomen bij hoge slibbelastingen. Het is niet bekend welke andere factoren bepalend zijn voor de groei van deze draadvormer. *Flexibacter*-draden hebben geen effect op de bezinksnelheid van de vlokken.

5.3.5 *Haliscomenobacter hydrossis*

Omschrijving

Haliscomenobacter hydrossis (figuur 45) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte draden, die uit de vlokken steken;
- lengte draden < 200 µm;
- diameter cellen 0,3 - 0,4 µm;
- vrijwel nooit aangroei;
- schede aanwezig;
- septa niet zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

De dunne, rechte draden van *H.hydrossis* zijn dermate karakteristiek, dat verwisseling met andere draadvormers niet snel zal plaatsvinden. De dunne stelen van *Hyphomicrobium* cellen (geen draadvormer) kunnen echter wel voor *H.hydrossis* draden worden aangezien.

Voorkomen in actiefslib

H.hydrossis komt algemeen voor in actief-slibinstallaties. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormer:

- slibbelastingen (communaal afvalwater) > ca. 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag.
In industriële installaties kan *H.hydrossis* zich ook bij lagere belastingen massaal ontwikkelen;
- veel laagmoleculaire verbindingen in het influent (agro-industrie);
- een influent met veel stikstofverbindingen;
- volledige menging in de beluchtingsruimte;
- een laag zuurstofgehalte in de beluchtingsruimte;
- waarschijnlijk ook gebrek aan fosfaat.

In communale installaties met biologische nutriëntenverwijdering is de *H.hydrossis* populatie altijd klein. In industriële installaties, met veel gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen in het influent, kan deze draadvormer zich wel massaal ontwikkelen.

5.3.6 *Leucothrix*

Omschrijving

Leucothrix (figuur 46) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen/kronkelige draden, los in het water tussen de vlokken;
- lengte draden $\gg 200 \mu\text{m}$;
- diameter cellen sterk variabel (1,5 - 3,5 μm);
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa/insnoeringen duidelijk zichtbaar, tenzij in de cellen veel reservestoffen aanwezig zijn;
- celvorm variabel (discus, rond, staaf);
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Leucothrix kan alleen via nader onderzoek goed worden onderscheiden van morfologisch vergelijkbare soorten ('Cyanophyceae', Type 021N).

Leucothrix is daarom niet opgenomen in het determinatieschema.

Voorkomen in actiefslib

Leucothrix komt incidenteel voor in industriële installaties. De groei van deze draadvormer kan tot extreem hoge SVI-waarden leiden. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor *Leucothrix*:

- slibbelastingen $> \text{circa } 0,1 \text{ kg BZV/kg d.s.} \cdot \text{dag}$;
- afvalwater met veel gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen zoals vetzuren e.d.;
- volledige menging in de beluchtingsruimte;
- een relatief hoge zoutconcentratie (10 - 40 g/l);

5.3.7 *Microthrix parvicella*

Omschrijving

Microthrix parvicella (figuur 47) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen/kronkelige draden, los in het water of in/rond de vlokken;
- lengte draden vaak $< 200 \mu\text{m}$;
- diameter cellen circa 0,5 μm ;
- incidenteel enige aangroei;
- geen schede;
- septa niet duidelijk zichtbaar. Poly-P-granulen worden echter soms voor septa aangezien;
- geen zwavelopslag;
- Gram positief;

- Neisser positief (poly-P-granulen). Deze granulen worden kleiner als de groei stagneert ('s-zomers).

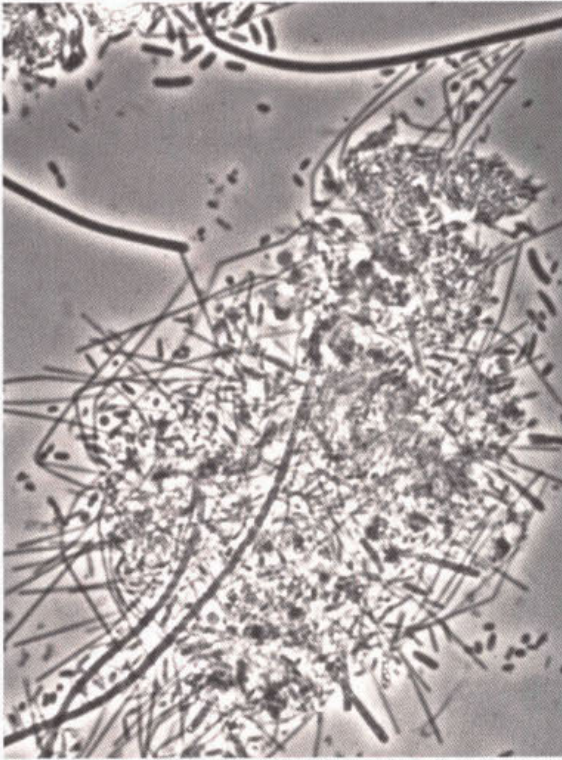
M.parvicella lijkt op *N.limicola* I. Laatstgenoemd organisme vormt echter wat robustere draden en wordt met Neisser grijsblauw gekleurd. Een fout bij de Gram kleuring, waardoor de draden rood en niet blauw kleuren, leidt in het determinatieschema naar Type 0581.

Voorkomen in actiefslib

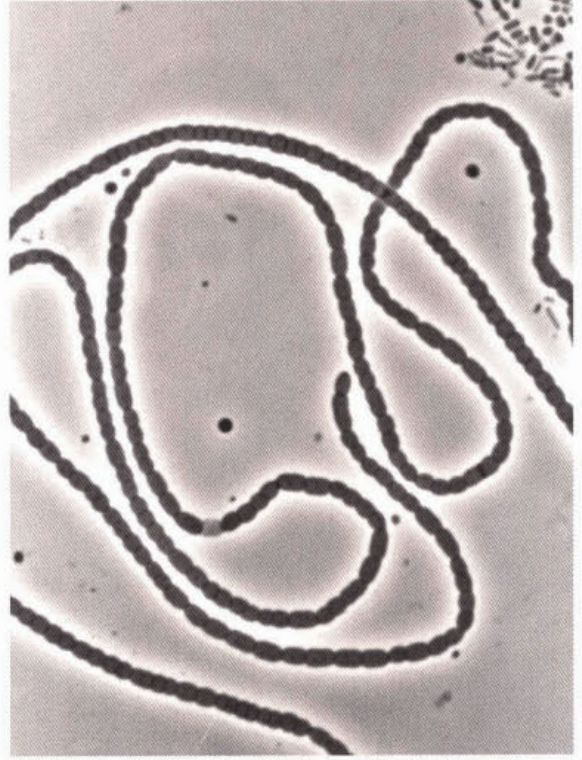
M.parvicella komt zeer algemeen voor in laagbelaste installaties met een communaal influent. Deze draadvormer is in veel landen (incl. Nederland) de belangrijkste oorzaak van licht slib in communale installaties en is daarnaast frequent verantwoordelijk voor het ontstaan van drijfslagen. Afvoer van surplusslib met veel *M.parvicella* draden naar de slibgisting kan ook in deze tank tot drijfslagvorming leiden. De populatiegrootte van deze draadvormer vertoont een uitgesproken seizoenspatroon: de populatie is maximaal aan het eind van de winter en minimaal in de zomer. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor de groei van *M.parvicella*:

- slibbelastingen < circa 0,2 kg BZV/kg d.s./dag;
- afvalwater met een substantieel gehalte aan hogere vetzuren zoals oliezuur. Dit is o.a. bij normaal, communaal afvalwater altijd het geval. In Nederland bestaat ca. 30% van het CZV van het ruwe influent uit hogere vetzuren;
- omstandigheden waarbij de in het influent aanwezige vetten hydrolyseren voordat ze de beluchtingsruimte bereiken. De hogere vetzuren komen hierbij vrij. Een lange verblijftijd in het aanvoerriool, de voorbezinktank of de anaërobe zone bij bio-P-processen is daarom gunstig voor *M.parvicella*;
- een laag zuurstofgehalte in de beluchtingsruimte en/of een grote anoxische zone (> 40 % van de inhoud van de 'aëratietank');
- watertemperatuur < circa 15 °C . *M.parvicella* groeit voornamelijk tijdens het najaar en de winter;
- mogelijk ook de aanvoer van gereduceerde zwavel- en stikstofverbindingen. Om deze reden is de terugvoer van water uit de slibverwerking 'verdacht'.

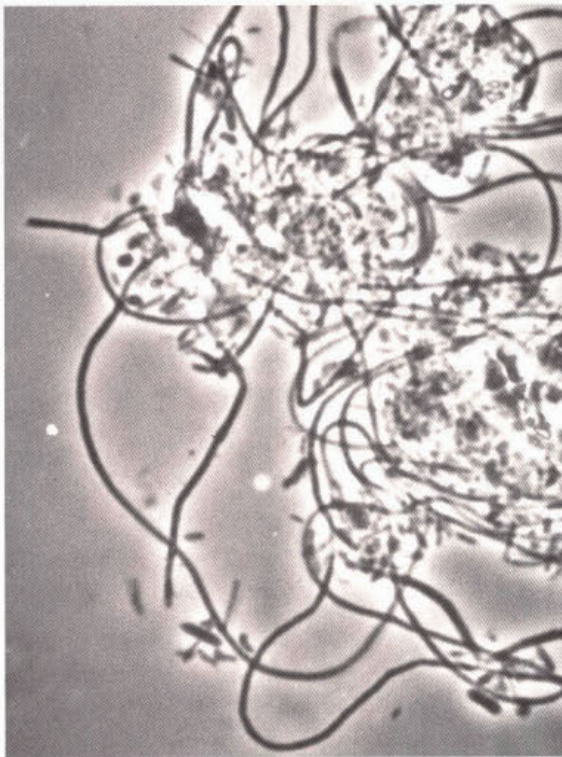
Deze combinatie betekent dat de procesomstandigheden in installaties voor nutriëntenverwijdering zeer gunstig zijn voor de groei van *M.parvicella*. In industriële installaties komt *M.parvicella* praktisch niet voor.



Figuur 45 *H. hydrossis* (1000 x).



Figuur 46 *Leucothrix* (900 x).



Figuur 47 *M. parvicella* (1200 x).



Figuur 48 *N. Limicola I* (900 x).

5.3.8 *Nostocoida limicola I*

Omschrijving

Nostocoida limicola I (figuur 48) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- vorm draden variabel. De draden kunnen zowel in de vlokken als los in de vloeistoffase aanwezig zijn;
- lengte draden < 200 µm;
- diameter cellen 0,6 - 0,7 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa niet duidelijk zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram positief;
- Neisser positief; soms kleuren de cellen echter grijs in plaats van grijsblauw.

N.limicola I lijkt op *M.parvicella* en kan daarmee gemakkelijk verwisseld worden.

De draden van *N.limicola I* zijn echter wat robuster; daarnaast is het resultaat van de Neisser kleuring bij deze draadvormers verschillend.

N.B.: Zie ook *N.limicola III*

Voorkomen in actiefslib

N.limicola I komt incidenteel voor in installaties met een lage slibbelasting (oxydatieslootcondities) en een communale influent. Er is nog niets bekend over de factoren die de groei van deze draadvormer bepalen. De aanwezigheid van *N.limicola I* leidt tot flotatie van het slib, d.w.z. het ontstaan van een drijfslag. Het negatieve effect op de SVI is beperkt.

5.3.9 *Nostocoida limicola III*

Omschrijving

Nostocoida limicola III (figuur 49) is in feite een verzamelnaam voor een groep draadvormers, incl. de voorheen apart benoemde *N.limicola II*, met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen tot sterk kronkelige draden, die soms kluwens gevormd hebben. De kluwens zijn vaak opgenomen in de vlokken;
- lengte draden variabel, maar meestal > 200 µm;
- diameter cellen 0,8 - 2,0 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa zichtbaar;
- discusvormige tot ronde cellen;
- geen zwavelopslag;
- meestal Gram positief;

- meestal Neisser positief.

Het 'probleem' bij het determineren van *N.limicola III* betreft vooral de niet-consistente resultaten van de kleuringen. Alle combinaties (vier) kunnen worden waargenomen, vooral in slibben uit industriële installaties. Omdat ook de diameter nogal sterk variabel is, omvat *N.limicola III* waarschijnlijk een groep, onderling verwante soorten. Deze kunnen op basis van hun morfologische kenmerken gemakkelijk van andere draadvormers worden onderscheiden.

Voorkomen in actiefslib

N.limicola III wordt heel frequent waargenomen in actiefslib; bij lage slibbelastingen (nutriëntenverwijdering) is de populatie in Nederlandse, communale installaties echter altijd klein. Bij wat hogere slibbelastingen en in industriële installaties kunnen wel grote populaties aanwezig zijn. Omdat de (kluwens van) draden vaak in slibvlokken zijn opgenomen, is het effect op de SVI beperkt. Hun aanwezigheid leidt echter wel tot het ontstaan van een drijfslag. Hoewel dit nog niet definitief is vastgesteld, zijn de volgende procesomstandigheden waarschijnlijk gunstig voor *N.limicola III*:

- slibbelastingen van 0,1 - 0,3 kg BZV/kg d.s.-dag;
- industrieel afvalwater met veel gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen (agro-industrie);
- voorbezinken van het influent;
- lage watertemperaturen, i.c. de winterperiode in communale installaties;
- mogelijk ook tekorten aan nutriënten;
- volledige menging in de beluchtingsruimte.

De beschikbare kennis is nog onvolledig.

5.3.10 Schimmels

Omschrijving

Schimmels (figuur 50) zijn draadvormende micro-organismen met de volgende eigenschappen:

- echte vertakkingen;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden;
- lengte draden > 200 µm;
- diameter cellen meestal > 2,5 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa duidelijk zichtbaar;
- rechthoekige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram 'negatief' ; schimmeldraden kleuren vaak niet egaal;
- Neisser negatief.

Schimmels vormen forse, vertakte draden (hyfen), die al bij een lage vergroting gemakkelijk van andere draadvormende organismen onderscheiden kunnen worden.

Voorkomen in actiefslib

Schimmels worden slechts zelden, en nooit dominerend, in communale installaties waargenomen. Ook in industriële installaties veroorzaken schimmels vrijwel nooit licht slib. Er is meestal sprake van een zeer lage pH als schimmels in de populatie gaan domineren.

5.3.11 *Sphaerotilus natans*

Omschrijving

Sphaerotilus natans (figuur 51) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- vaak valse vertakkingen;
- niet beweeglijk;
- rechte tot enigszins gebogen draden;
- lengte draden > 200 µm;
- diameter draden: 1,0-1,5 µm;
- soms aangroei;
- schede aanwezig (vaak pas zichtbaar na de Gram kleuring);
- septa duidelijk zichtbaar;
- rechthoekige tot staafvormige cellen;
- geen zwavelopslag. In de industriële installaties kunnen wel andere reservestoffen aanwezig zijn;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Als de vertakkingen ontbreken, kan deze draadvormer verwisseld worden met Type 0041 (Gram positief, kortere cellen), met Type 021N (kortere cellen, geen aangroei, geen schede) of met Type 0961 (cellen duidelijk langer en opvallend transparant).

Voorkomen in actiefslib

De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor *S. natans*:

- tekorten aan O₂, N, of P;
- veel laagmoleculaire verbindingen in het influent (agro-industrie);
- slibbelastingen > circa 0,2 kg BZV/kg d.s./dag;
- volledige menging in de beluchtingsruimte.

In moderne laagbelaste installaties met biologische nutriëntenverwijdering komt *S. natans* vrijwel niet voor. In industriële installaties, met veel gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen in het influent, veroorzaakt deze draadvormer echter regelmatig licht slib. Ook in proefinstallaties (synthetisch influent) groeit *S. natans* vaak uitstekend. Een massale groei van *S. natans* leidt tot een extreem hoge SVI.

5.3.12 “Streptococcus”

Omschrijving

“Streptococcus” (figuur 52) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet bewegelijk;
- gebogen/kronkelige draden, los in het water tussen de vlokken;
- lengte draden < 200 μm ;
- diameter cellen ca. 0,7 μm ;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa/insnoeringen duidelijk zichtbaar;
- ronde cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram positief;
- Neisser negatief.

Deze draadvormer lijkt morfologisch sprekend op een streptococ en is ook Gram positief. Het is echter nog niet definitief vastgesteld of deze naam correct is.

“Streptococcus” lijkt op Type 1863. Deze is echter Gram negatief.

“Streptococcus” is niet opgenomen in het determinatieschema.

Voorkomen in actiefslib

Streptococci worden slechts zelden in actiefslib waargenomen. Ze hebben geen effect op de bezinksnelheid van het slib. Het is niet bekend welke factoren bepalend zijn voor hun groei in zuiveringsinstallaties.

5.3.13 *Thiothrix*

Omschrijving

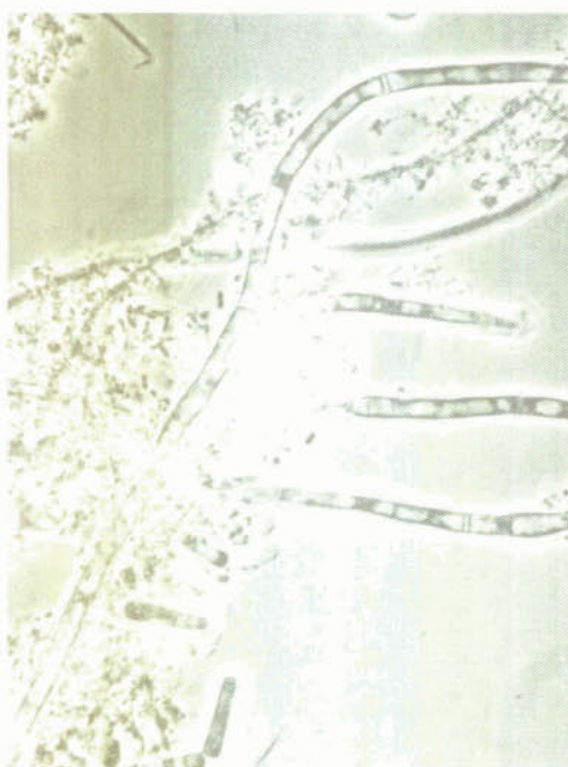
De naam *Thiothrix* (figuur 53) omvat een groep van draadvormende bacteriën met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet bewegelijk;
- rechte/gebogen draden, die meestal uit de vlokken steken;
- lengte van de draden: sterk variabel;
- diameter cellen variabel (0,5 - 1,5 μm), soms binnen één draad afnemend naar het uiteinde toe (=tapering);
- geen aangroei;
- bij enkele soorten is ene schede aanwezig;
- septa duidelijk zichtbaar als de cellen niet volledig met zwavelbollen zijn gevuld;
- vierkante tot rechthoekige cellen;
- incidenteel rosetten;
- zwavelgranulen aanwezig (in vivo of na de S-test);
- meestal Gram negatief;
- Neisser negatief.

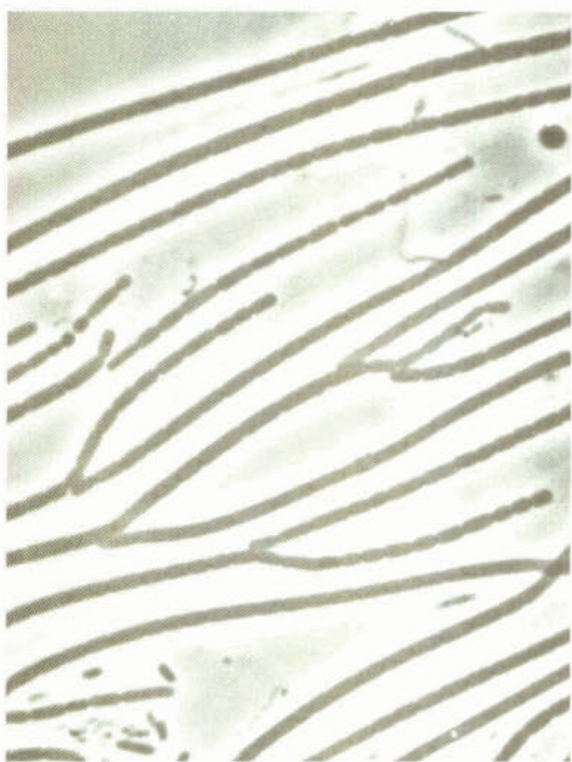
Thiothrix draden zijn meestal aan de vlok gehecht. De zwavelbolletjes zijn zeer kenmerkend. Als in de wat dikkere draden weinig S aanwezig is, kan *Thiothrix* gemakkelijk verwisseld worden met Type 021N.



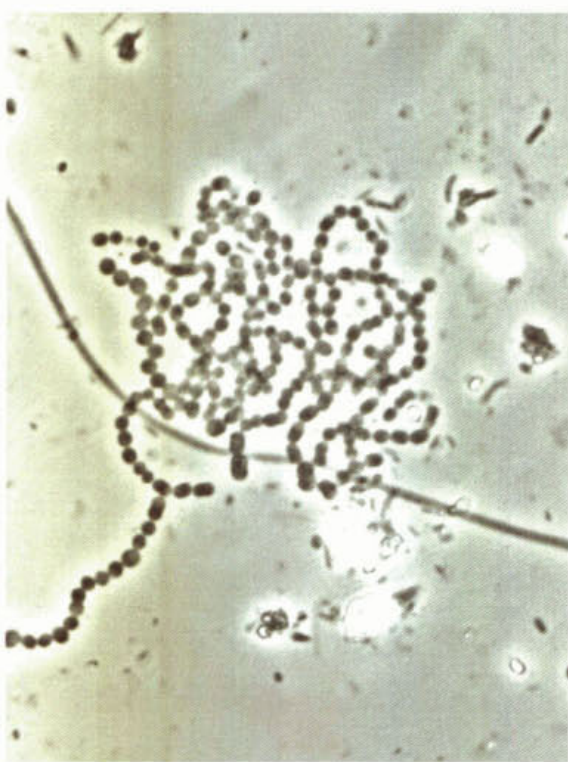
Figuur 49 *N. limicola* III (900 x).



Figuur 50 Voorbeeld van een schimmel (400 x).



Figuur 51 *S. natans* (900 x).



Figuur 52 'Streptococcus' (900 x).

Thiothrix gebruikt naast laagmoleculaire verbindingen, zoals vetzuren, ook gereduceerde zwavelverbindingen om te groeien. De sulfides worden geoxideerd en elementaire zwavel wordt als tussenproduct tijdelijk in de cel opgeslagen. Dit zijn de heldere bolletjes die microscopisch kunnen worden waargenomen. Deze verdwijnen als het slib enkele dagen in een koelkast wordt bewaard.

Voorkomen in actiefslib

De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor *Thiothrix*: gereduceerde zwavelverbindingen in het influent;

- veel laagmoleculaire koolstofverbindingen in het influent;
- slibbelastingen > circa 0,1 kg BZV/kg d.s.·dag;
- tekorten aan O₂, N of P;
- volledige menging in de beluchttingsruimte.

In moderne laagbelaste installaties (biologische nutriëntenverwijdering) komt *Thiothrix* vrijwel niet voor, tenzij in het influent ongebruikelijk hoge sulfidegehalten aanwezig zijn (sterk aangerot afvalwater). Bij hoge slibbelastingen en in industriële installaties kunnen wel grote *Thiothrix* populaties aanwezig zijn en licht slib veroorzaken.

5.3.14 Type 0041/0675

Omschrijving

Type 0041 (figuur 54) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden, zowel los in het water als verbonden met de vlokken;
- lengte draden variabel;
- diameter cellen variabel (0,6 - 1,5 µm);
- in communale installaties altijd veel aangroei; in industriële installaties soms ook 'schone' draden;
- schede aanwezig;
- septa zichtbaar (bij veel aangroei alleen aan het uiteinde van de draden);
- vierkante cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram positief;
- Neisser negatief.

Type 0041 omvat de Gram positieve, schedevormende bacteriën, incl. het voorheen apart benoemde Type 0675, maar excl. Type 1851. De laatstgenoemde kleurt lichtblauw met Gram en heeft ook veel langere, rechthoekige cellen. Type 0041 omvat een aantal 'soorten', die qua celdiameter van elkaar verschillen.

De wat dikkere Type 0041 draden kunnen verwisseld worden met die van *S.natans* (Gram negatief en rechthoekige cellen), met Type 021N (Gram negatief) of met *Thiothrix* draden (S-granulen en Gram negatief).

Voorkomen in actiefslib

Type 0041 komt zeer algemeen voor in actiefslib. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormer:

- slibbelastingen < circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag;
- menging van ruw, stedelijk influent en retourslib voordat deze stromen de beluchtingsruimte bereiken. Dit betekent dat Type 0041 in communale installaties vooral groeit op componenten die in niet-opgeloste vorm met het influent worden aangevoerd. Het is niet bekend of dit ook geldt voor industrieel afvalwater.

Er is dus nog niet veel bekend over de factoren die de groei van deze draadvormer bepalen.

De populatie van Type 0041 in communale installaties met nutriëntenverwijdering is altijd klein als geen voormenging wordt toegepast. Voormenging stimuleert de groei van deze draadvormer. Dit leidt echter praktisch nooit tot hoge waarden van de SVI (veelal stabilisatie op 120 à 130 ml/g).

In industriële installaties kan de ontwikkeling van Type 0041 wel tot hoge SVI-waarden leiden.

5.3.15 Type 0092

Omschrijving

Type 0092 (figuur 55) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden;
- lengte draden < 200 µm;
- diameter cellen 0,5 - 0,7 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa niet duidelijk zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser positief (draden grijsblauw).

In communale installaties is Type 0092 meestal grotendeels 'verstopt' in de vlokken, waardoor in ongekleurde preparaten alleen de korte uiteinden van de draden zichtbaar zijn. Deze kunnen verwisseld worden met *H. hydrossis* (Neisser negatief en draden meestal langer).

Doordat de draden van Type 0092 grotendeels in vlokken zijn opgenomen, wordt de populatiegrootte van deze draadvormer gemakkelijk onderschat. Na de Neisser kleuring is pas duidelijk zichtbaar hoe groot de populatie werkelijk is.

Voorkomen in actiefslib

Type 0092 komt algemeen voor in actiefslib. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormer:

- slibbelastingen < circa 0,1 kg BZV/kg d.s.-dag;
- ruw influent;
- watertemperaturen > circa 15 °C;

Er is dus nog niet veel bekend over de factoren die de groei van deze draadvormer bepalen.

In communale installaties vertoont de populatiegrootte een seizoensritme, met het maximum in de zomer/herfst. Doordat de draden grotendeels in vlokken zijn opgenomen, is het effect op de SVI beperkt. In veel installaties gaat het verdwijnen van *M. parvicella* in april/mei gepaard met een toename van Type 0092. Dit suggereert dat beide draadvormers hetzelfde substraat kunnen gebruiken. Deze veronderstelling wordt echter tot nu toe niet door feiten gestaafd. Er is nog vrijwel niets bekend over de fysiologie van deze bacterie.

Incidenteel worden Type 0092 draden in industriële installaties (o.a. bij zuivelafvalwater) wel massaal vrij in het water tussen de vlokken waargenomen.

5.3.16 Type 0211

Omschrijving

Type 0211 (figuur 56) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen/kronkelige draden (in en rond de vlokken);
- lengte draden < 200 μm ;
- diameter cellen 0,2 - 0,3 μm ;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa/insnoeringen duidelijk zichtbaar;
- staafvormige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Type 0211 zou verwisseld kunnen worden met Type 1863. Laatstgenoemde draadvormer is echter aanmerkelijk dikker.

Type 0211 is niet opgenomen in het determinatieschema.

Voorkomen in actiefslib

Type 0211 is incidenteel waargenomen in actiefslib. Het is niet bekend welke factoren bepalend zijn voor de groei van deze draadvormer in zuiveringsinstallaties.

5.3.17 Type 021N

Omschrijving

Type 021N (figuur 57) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden, meestal los in de vloeistof;
- lengte draden > 200 μm ;
- celdiameter variabel; meestal 1,5 à 2,0 μm , maar soms afnemend naar het uiteinde van de draad;

- geen aangroei;
- geen schede;
- septa duidelijk zichtbaar;
- celvorm variabel (discus, bijna vierkant en staafvormig). Soms zijn in de draden enkele bijna zwarte cellen aanwezig;
- incidenteel rosetten;
- geen/weinig zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

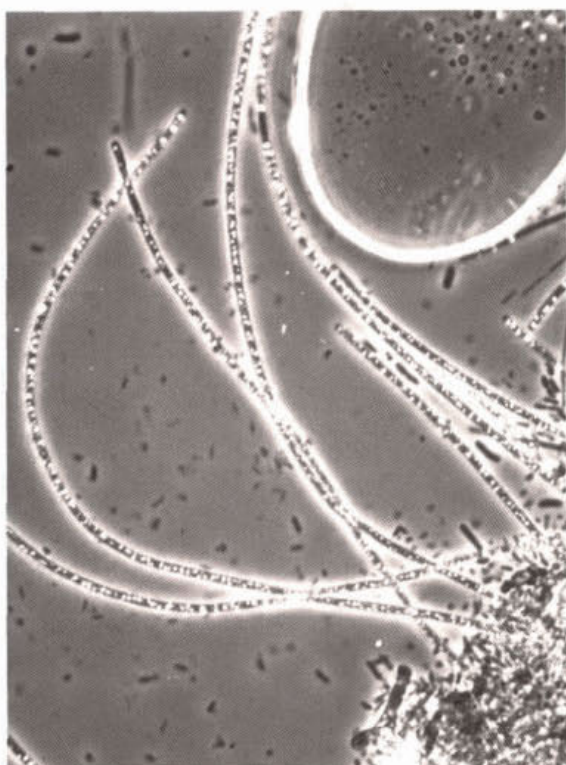
Type 021N kan gemakkelijk verwisseld worden met *Thiothrix*. Beide soorten zijn ook verwant aan elkaar. *Thiothrix* vormt echter veel zwavelgranulen (in vivo of bij de S-test), terwijl Type 021N nauwelijks zwavel opslaat. Als bij Type 0041 de aangroei ontbreekt, lijken de draden eveneens op die van Type 021N. Type 0041 is echter Gram positief.

Voorkomen in actiefslib

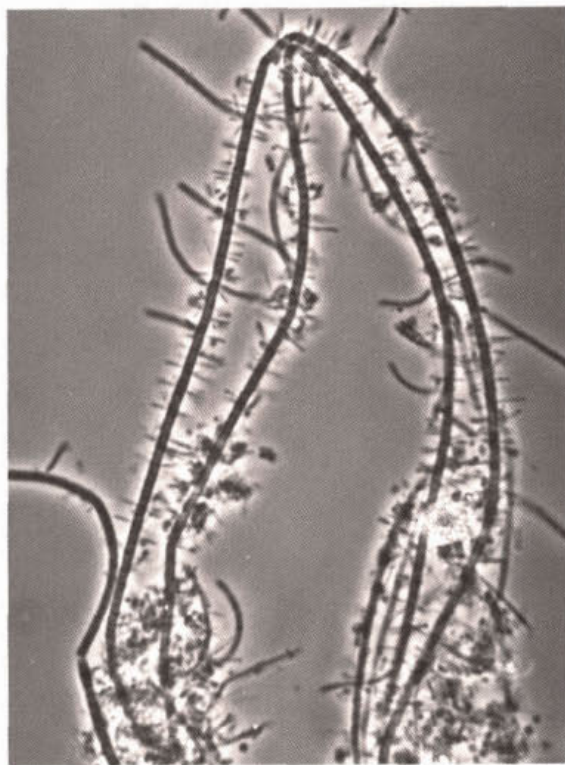
Type 021N wordt frequent waargenomen in actiefslib. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormer:

- een breed traject van slibbelastingen (0,05 - 0,4 kg BZV/kg d.s.·dag), met wel een grotere kans op een massale groei bij belastingen > 0,1 kg BZV/kg d.s.·dag;
- een influent met veel gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen (vetzuren, enz.). Deze kunnen zowel in de aanvoerlijn zijn ontstaan (aangerot rioolwater), als afkomstig zijn van industriën;
- tekorten aan nutriënten, incl. zuurstof;
- volledige menging in de beluchtingsruimte.

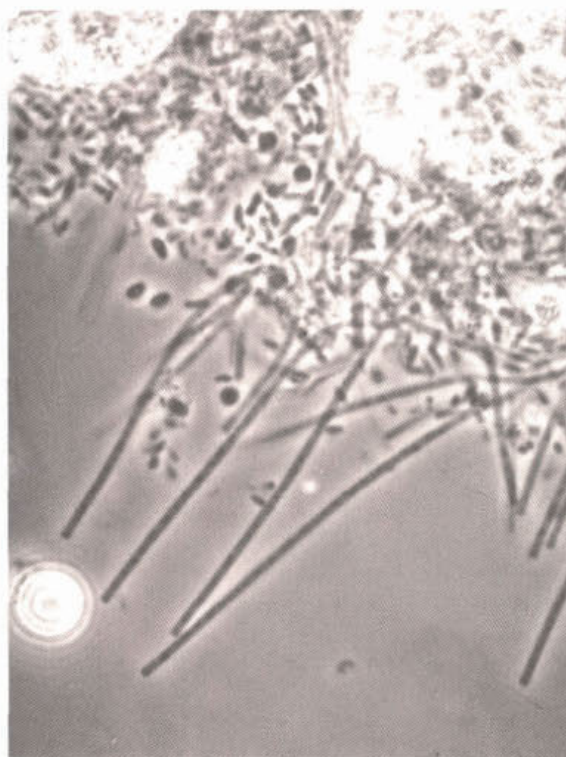
In communale installaties met biologische nutriëntenverwijdering wordt het substraat, dat Type 021N nodig heeft om te groeien, onder anoxische/anaërobe omstandigheden door vlokvormende bacteriën uit het water verwijderd. De strikt aërobe Type 021N wordt bij deze procesomstandigheden alleen nog als secundaire draadvormer aangetroffen. In industriële installaties en in communale systemen zonder nutriëntenverwijdering veroorzaakt Type 021N echter frequent licht slib.



Figuur 53 Zwavelbolletjes in Thiothrix draden
(900 x).



Figuur 54 Type 0041 (900 x).



Figuur 55 Type 0092 (900 x).



Figuur 56 Type 0211 (900 x).

5.3.18 Type 0411

Omschrijving

Type 0411 (figuur 58) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen/'kronkelige' draden, vaak langs de rand van de vlokken;
- lengte draden < 200 μm ;
- diameter cellen 0,5 - 0,7 μm ;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa/insnoeringen duidelijk zichtbaar;
- staafvormige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Type 0411 is niet opgenomen in het determinatieschema.

Voorkomen in actiefslib

Type 0411 wordt incidenteel waargenomen bij hoge slibbelastingen (> ca. 0,3 kg BZV/kg d.s.-dag). Het is niet bekend welke andere factoren bepalend zijn voor de groei van Type 0411 in actiefslib. De invloed van deze draadvormer op de bezink-snelheid van de vlokken is gering.

5.3.19 Type 0581

Omschrijving

Type 0581 (figuur 59) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen/kronkelige draden, los in het water of langs de vlokken;
- lengte draden < 200 μm ;
- diameter cellen 0,3 - 0,4 μm ;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa niet zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Morfologisch lijkt Type 0581 sprekend op *M.parvicella*, alleen bij de Gram en Neisser kleuringen is sprake van duidelijke verschillen tussen beide draadvormers. Type 0581 is ook iets dunner. Ondanks deze verschillen is het niet uitgesloten dat het 2 groeivormen van één soort betreft.

Voorkomen in actiefslib

Type 0581 wordt incidenteel waargenomen in communale, laagbelaste installaties met een discontinue toevoer van influent.

5.3.20 Type 0803

Omschrijving

Type 0803 (figuur 60) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden. Deze zijn vaak aan een brokje anorganisch materiaal (zandkorrels e.d.) gehecht;
- lengte draden $< 200 \mu\text{m}$;
- diameter cellen $0,7-0,8 \mu\text{m}$;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa duidelijk zichtbaar, geen insnoeringen;
- vierkante cellen;
- geen duidelijke zwavelopslag, maar in de cellen zijn soms wel kleine, donkere bolletjes aanwezig. De reactie op de S-test is echter negatief;
- meestal Gram negatief, maar soms Gram positief;
- Neisser negatief.

Als bij het onderzoek de septa niet goed zijn gezien, leidt het volgen van de determinatieboom naar Type 1851 (lichtblauw met Gram en vaak veel aangroei), *H. hydrossis* (dunne, veelal kaarsrechte draden) of Type 0092 (Neisser positief).
N.B. : Zie ook Type 0914. Beide soorten zijn waarschijnlijk sterk verwant.

Voorkomen in actiefslib

Type 0803 wordt regelmatig in actiefslib waargenomen. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormer:

- slibbelastingen $< \text{circa } 0,2 \text{ kg BZV/kg d.s.} \cdot \text{dag}$;
- industrieel afvalwater (textiel, farmaceutisch);
- mogelijk ook anaëroob voorbehandeld afvalwater.

In installaties met een voornamelijk huishoudelijk influent is Type 0803 frequent aanwezig, maar vrijwel nooit massaal. Voordenitrificatie leidt tot het verdwijnen van Type 0803 (en Type 0914), met Bio-P-processen verschuift de populatie richting Type 0914. In installaties met (voornamelijk) industrieel influent kan Type 0803 wel massaal aanwezig zijn en licht slib veroorzaken.

5.3.21 Type 0914

Omschrijving

Type 0914 (figuur 61) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden, meestal langs de rand van de vlokken;
- lengte draden $< 200 \mu\text{m}$;
- diameter cellen $0,6 - 0,8 \mu\text{m}$;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa niet of slecht zichtbaar;

- in vivo al zwavelgranulen aanwezig;
- Gram positief;
- Neisser negatief.

De korte, met zwavelbolletjes gevulde draden van Type 0914 zijn zeer kenmerkend. De kans op verwisseling met soorten die eveneens zwavel kunnen opslaan is niet erg groot. *Thiothrix* vormt meestal langere draden en is Gram negatief, *Beggiatoa* heeft een karakteristieke beweging.

Als de zwavelgranulen uit Type 0914 worden verwijderd, lijken de draden sprekend op die van Type 0803. De populaties van beide typen zijn ook vaak complementair: Als de ene verdwijnt, verschijnt de andere en vice versa. Het is daarom zeer waarschijnlijk dat de Typen 0914 en 0803 groeivormen van dezelfde bacterie zijn.

Voorkomen in actiefslib

Type 0914 wordt aangetroffen in installaties waarvan het influent gereduceerde zwavelverbindingen bevat en waarin een slibbelasting kleiner dan circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag wordt toegepast. De zwavelverbindingen kunnen met het influent worden aangevoerd, maar ook in de installatie gevormd worden. Voorbezinken van het influent en Bio-P-processen (anaërobe periode) stimuleren de ontwikkeling van Type 0914. De populatie is echter altijd klein in installaties met een hoofdzakelijk huishoudelijk influent. In industriële installaties zijn incidenteel wel veel Type 0914 draden aanwezig.

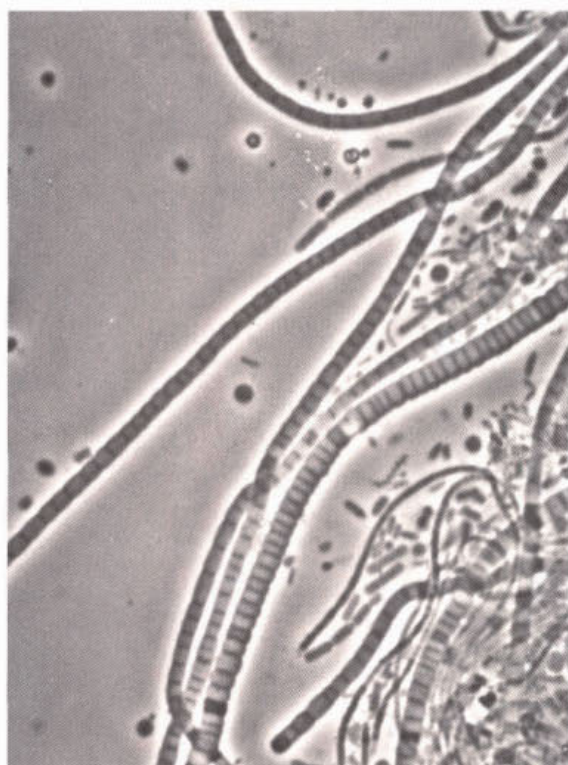
5.3.22 Type 0961

Omschrijving

Type 0961 (figuur 62) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden die vaak opvallend transparant zijn;
- lengte draden > 200 µm;
- diameter cellen 1,0 - 2,0 µm;
- geen aangroei;
- het is niet zeker of een schede aanwezig is;
- septa duidelijk zichtbaar, geen insnoeringen;
- vierkante/rechthoekige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Type 0961 kan verwisseld worden met dikke *Thiothrix* soorten (S-opslag en niet zo transparant) en Type 1852 (celdiameter ca. 0,7 µm).



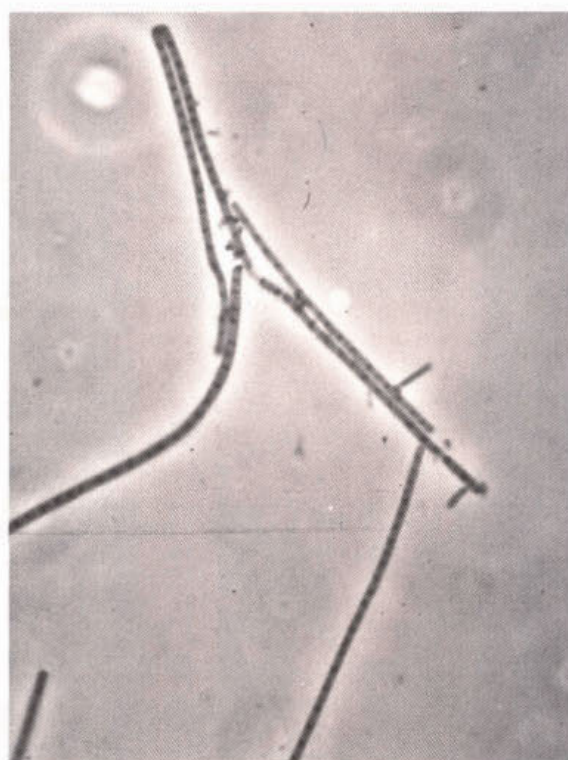
Figuur 57 *Type 021N (900 x).*



Figuur 58 *Type 0411 (750 x).*



Figuur 59 *Type 0581 (1150 x).*



Figuur 60 *Type 0803 (1200 x).*

Voorkomen in actiefslib

Type 0961 wordt niet zo vaak waargenomen in actiefslib. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormer:

- slibbelastingen > circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag;
- afvalwater met veel gemakkelijk biodegradeerbare componenten (agro-industrie).

De feitelijke kennis over deze draadvormer is dus nog zeer beperkt. In industriële installaties kan Type 0961 zich soms massaal ontwikkelen, hetgeen met hoge SVI-waarden gepaard gaat, in communale systemen met nutriëntenverwijdering komt deze draadvormer vrijwel nooit voor.

5.3.23 Type 1701

Omschrijving

Type 1701 (figuur 63) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- incidenteel valse vertakkingen;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden, vaak gehecht aan de vlok;
- lengte draden < 200 µm;
- diameter cellen 0,7 - 0,9 µm;
- vaak aangroei;
- schede aanwezig;
- septa zichtbaar (bij sterke aangroei alleen aan het schone uiteinde);
- staafvormige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Als vertakkingen aanwezig zijn, leidt het determinatieschema naar *S.natans* (aanmerkelijk dikkere draden). Als de septa niet waargenomen worden, kan Type 1701 verwisseld worden met Type 1851 (Gram positief), *H.hydroxsis* (dunnere draden zonder aangroei) of Type 0092 (neisser positief).

Voorkomen in actiefslib

Type 1701 wordt niet zo vaak in actiefslib waargenomen. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor deze draadvormende bacterie:

- slibbelastingen > circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag;
- afvalwater met een hoog gehalte aan koolhydraten, vooral zetmeel;
- lage zuurstofgehalten in de beluchtingsruimte;
- volledige menging in de aeratietank;
- relatief hoge watertemperaturen (> ca. 15 °C).

Dit betekent dat Type 1701 vrijwel niet voorkomt in communale installaties met nutriëntenverwijdering. Deze draadvormer groeit vooral in installaties voor de zuivering van afvalwater van bepaalde agro-industriën en kan daar hoge SVI-waarden veroorzaken.

5.3.24 Type 1702

Omschrijving

Type 1702 (figuur 64) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden die uit de vlokken steken;
- lengte draden $< 200 \mu\text{m}$;
- celdiameter circa $0,6 \mu\text{m}$;
- geen aangroei;
- schede aanwezig;
- septa niet zichtbaar;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Type 1702 kan verwisseld worden met *H. hydrossis* (dunnere draden) en met Type 0092 (Neisser positief).

Type 1702 is niet in het determinatieschema opgenomen.

Voorkomen in actiefslib

Type 1702 wordt slechts incidenteel waargenomen. Het is niet bekend welke procesomstandigheden de groei van deze draadvormer stimuleren.

5.3.25 Type 1851

Omschrijving

Type 1851 (figuur 65) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden, die uit de vlokken steken en soms bundels vormen;
- lengte draden variabel, maar meestal $> 200 \mu\text{m}$;
- diameter cellen $0,5 - 0,7 \mu\text{m}$;
- meestal veel aangroei. In industriële installaties soms schone draden;
- schede aanwezig;
- septa vaak niet duidelijk zichtbaar;
- rechthoekige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram positief. De lichtblauwe kleur is zeer karakteristiek;
- Neisser negatief.

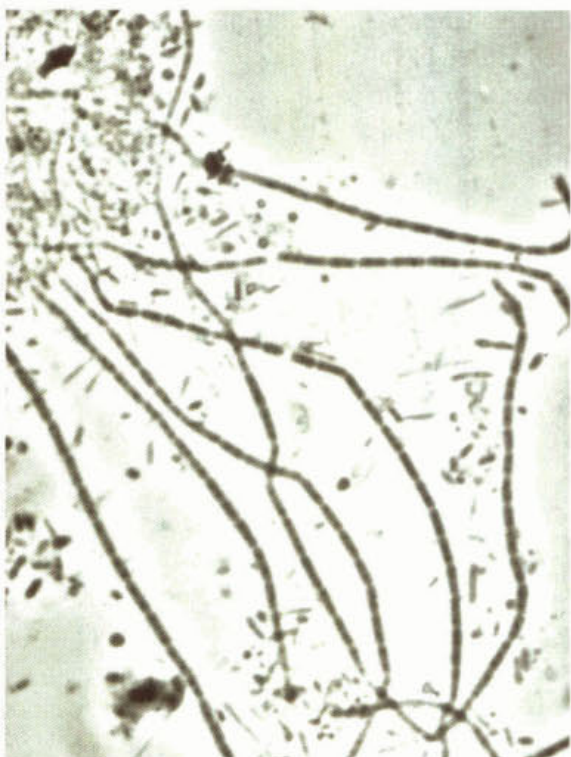
Type 1851 kan verwisseld worden met dunne Type 0041 draden (donkerblauw met Gram en veel kortere cellen). Als in Type 1851 wel septa worden waargenomen, leidt het determinatieschema naar Type 1701 (staafvormige cellen en Gram negatief).



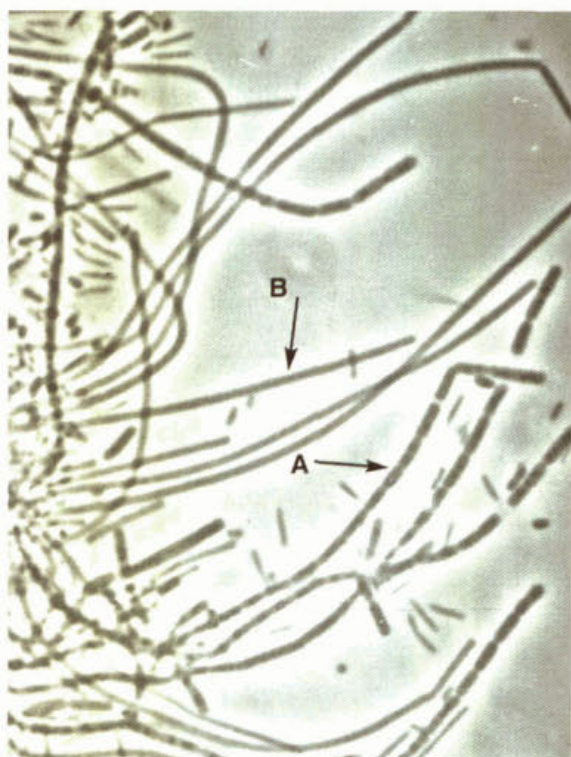
Figuur 61 Type 0914 (900 x).



Figuur 62 Type 0961 (900 x).



Figuur 63 Type 1701 (900 x).



Figuur 64 Type 1701 (a) en 1702 (b) (1250 x).

Voorkomen in actiefslib

Type 1851 wordt regelmatig in laagbelaste actief-slibinstallaties waargenomen, maar is in communale systemen vrijwel nooit dominant aanwezig. In industriële installaties (agro industrie) kunnen wel grote populaties van deze draadvormer aanwezig zijn. De volgende procesomstandigheden zijn gunstig voor de groei van Type 1851:

- slibbelastingen < circa 0,15 kg BZV/kg d.s.·dag;
 - laagmoleculaire verbindingen (agro industrie).
- De kennis over deze draadvormer is dus nog zeer beperkt.

5.3.26 Type 1852

Omschrijving

Type 1852 (figuur 66) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- rechte/gebogen draden die vaak transparant lijken;
- lengte draden > 200 µm;
- diameter cellen 0,6 - 0,8 µm;
- geen aangroei;
- schede aanwezig;
- septa duidelijk zichtbaar;
- rechthoekige cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

Type 1852 kan verwisseld worden met dunne Thiothrix soorten (vormen zwavelgranulen) en met Type 0961 (celdiameter > 1,0 µm).

Voorkomen in actiefslib

Type 1852 behoort tot de zeldzame soorten en is niet in het determinatieschema opgenomen. Het is niet bekend welke procesomstandigheden de groei van deze draadvormer stimuleren.

5.3.27 Type 1863

Omschrijving

Type 1863 (figuur 67) is een draadvormende bacterie met de volgende kenmerken:

- niet vertakt;
- niet beweeglijk;
- gebogen/kronkelige draden, los in de vloeistof;
- lengte draden < 200 µm;
- diameter cellen 0,5 - 0,8 µm;
- geen aangroei;
- geen schede;
- septa duidelijk zichtbaar;

- ronde cellen;
- geen zwavelopslag;
- Gram negatief;
- Neisser negatief.

De kettinkjes van Type 1863 kunnen verwisseld worden met "Streptococce" (Gram positief) en Type 0211 (draden dunner).

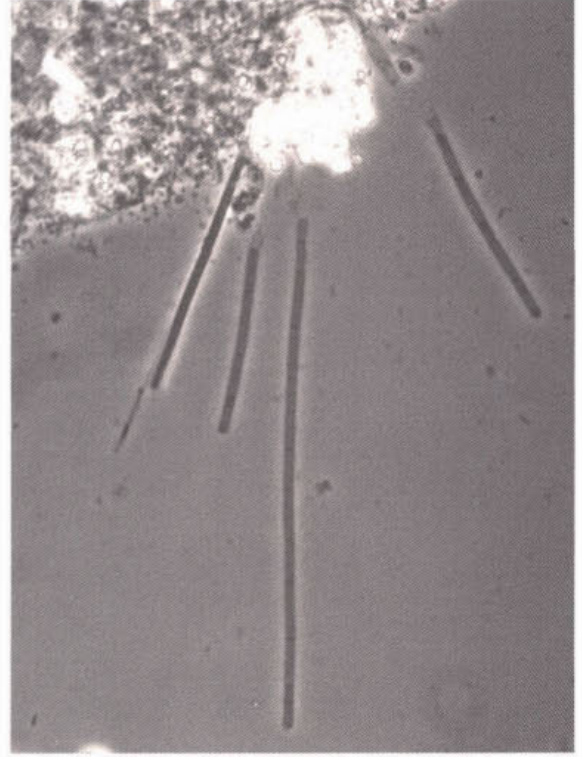
Recent is vastgesteld dat Type 1863 een aantal morfologisch identieke, maar fysiologisch verschillende soorten omvat.

Voorkomen in actiefslib

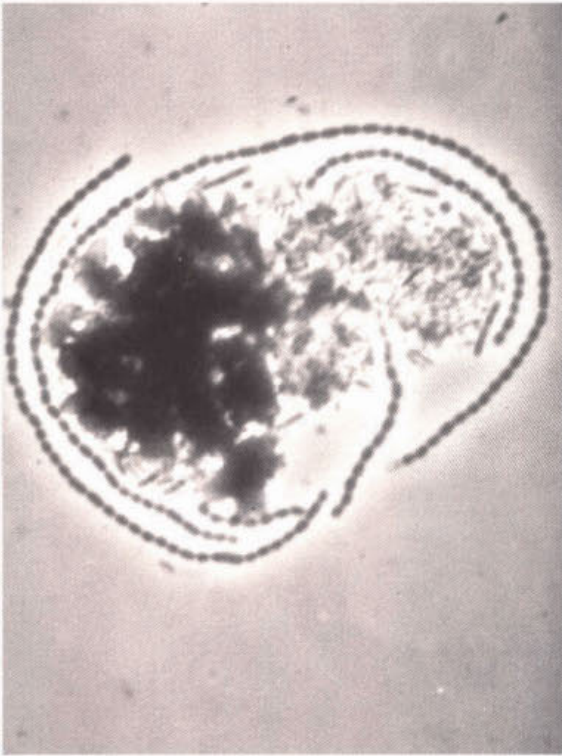
Type 1863 wordt voornamelijk waargenomen bij hoge slibbelastingen (0,3 - 0,6 kg BZV/kg d.s.-dag). Het is niet bekend welke andere procescondities de groei van deze draadvormer bevorderen. Type 1863 heeft geen effect op de bezinksnelheid van de vlokken, maar kan, hoewel de draden Gram negatief zijn, wel bijdragen aan het ontstaan van drijfslagen.



Figuur 65 *Type 1851 (650 x).*



Figuur 66 *Type 1852 (625 x).*



Figuur 67 *Type 1863 (900 x).*

6 Protozoën en metazoën

In actiefslib zijn bijna altijd protozoën en vaak ook metazoën aanwezig. Sommige soorten zijn aan de vlokken gehecht, andere zwemmen in het water tussen de vlokken. Deze organismen zijn (veel) groter dan de bacteriën; hun 'lengte' kan variëren van 10 tot 10.000 μm (tabel 2). Bovendien hebben ze een karakteristieke vorm. Door deze combinatie van eigenschappen vallen ze erg op in een microscopisch preparaat.

Tabel 2 Orde van grootte van (micro-)organismen in actiefslib.

Soort	Lengte van de cellen (μm)	Opmerkingen
bacteriën	1 - 5	soms kolonies of draden
protozoën		
• flagellaten	10 - 30	soms kolonies
• amoeben	30 - 400	
• schaalamoeben	30 - 200	
• zonnediertjes	40 - 200	
• ciliaten ¹⁾	25 - 400	soms kolonies
metazoën		
• rotiferen	100 - 500	
• nematoden	500 - 3.000	
• beertjes	200 - 1.200	
• wormen	3.000 - 10000	

¹⁾ Enkele soorten zijn veel langer (tot 1000 μm)

Veel protozoën/metazoën voeden zich voornamelijk met bacteriecellen die los in de vloeistof of aan de randen van de vlokken aanwezig zijn. Ze verwijderen op deze manier bacteriecellen die niet of nauwelijks vlokgebonden zijn. Deze kunnen via bezinken niet van het gezuiverde water worden gescheiden. Protozoën zijn dan ook onmisbaar voor een vergaande CZV-reductie, d.w.z. een helder effluent. Overigens zijn er ook protozoën/metazoën die slibvlokjes consumeren ($\rightarrow$ vermindering slibproductie) of soortgenoten opeten.

De aanwezigheid van bepaalde soorten zegt iets over de procesomstandigheden in de installatie. Het beoordelen van de samenstelling van de populatie is daarom een belangrijk onderdeel van microscopisch slibonderzoek. Op deze indicatorfunctie wordt in paragraaf 6.3 nader ingegaan.

In actiefslib zijn ruim 200 verschillende soorten waargenomen. Het identificeren van deze organismen is echter niet zo eenvoudig en vereist specialistische kennis. Voor procesbewaking is het ook niet nodig dat al deze soorten gedetermineerd kunnen worden; het kunnen onderscheiden van de belangrijkste hoofdgroepen is al toereikend. In de volgende paragrafen wordt daarom volstaan met een korte beschrijving van deze hoofdgroepen aan de hand van een aantal soorten die regelmatig in actiefslib aangetroffen worden.

6.1 Protozoën

Protozoën zijn ééncellige organismen, net als bacteriën. Mits de slibbelasting niet extreem hoog is, zijn ze in vrijwel iedere actiefslib aanwezig. De populatie is altijd veel kleiner dan die van de bacteriën; de in de installatie aanwezige biomassa bestaat voor hooguit enkele procenten uit protozoën.

De protozoën worden onderverdeeld in:

- ciliaten;
- flagellaten;
- (schaal)amoeben;
- zonnediertjes.

6.1.1 Ciliaten

De ciliaten worden gekenmerkt door de aanwezigheid van ciliën (= trilhaartjes) op hun celoppervlak. Bij sommige ciliaten is het oppervlak volledig met trilhaartjes bedekt, bij andere soorten slechts gedeeltelijk. Er zijn ook ciliaten waarbij de ciliën alleen tijdens een bepaalde levensfase aanwezig zijn.

Bij veel soorten zijn de trilhaartjes op een bepaalde manier ronde de mondopening gerangschikt. Hierdoor kunnen deze ciliaten het water in hun omgeving laten stromen. Ze waaieren hun voedsel als het ware naar hun mondopening toe. Deze voedseldeeltjes worden vervolgens via filtratie uit het water opgenomen. Daarnaast spelen de ciliën een rol bij de beweging van een aantal soorten.

De ciliaten nemen voedseldeeltjes op via hun mondopening. Dit voedsel kan, al naar gelang het soort organisme, zowel organische brokstukken als bacteriecellen of andere protozoën omvatten. Predatie speelt dus een belangrijke rol binnen zo'n gemengde populatie. Soms worden zelfs soortgenoten geconsumeerd. Enkele voorbeelden:

- ciliaten die vooral bacteriën eten: *Aspidisca*, *Blepharisma*, *Carchesium*, *Colpidium*, *Chilodonella*, *Epistylus*, *Opercularia*, *Vorticella*;
- omnivore ciliaten, die zowel bacteriën als flagellaten en kleine ciliaten eten: *Euplotes*, *Stentor*;
- carnivore soorten die voornamelijk andere ciliaten eten: *Litonotus*, *Trachelophyllum*, *Hemiophrys*, *Suctoriën*.

De met het influent aangevoerde bacteriecellen vormen een belangrijke voedselbron voor de ciliaten. Rioolwater bevat enkele tientallen mg/l aan bacterieel celmateriaal, een gehalte dat overigens aanmerkelijk kan variëren al naar gelang het type rioolstelsel, de weersomstandigheden, het jaargetijde, enz. Het aantal cellen dat geconsumeerd wordt houdt ten nauwste verband met het formaat van het organisme. Zo consumeren kleine ciliaten circa 10 cellen/min., de grotere (b.v. *Opercularia*) ruim 10-maal zoveel en sommige soorten nematoden 5000 cellen/min. De ciliaten benutten het voedsel vooral voor het maken van nieuwe cellen;

beweging kost weinig energie. Als vuistregel geldt dat 50% van het beschikbare voedsel gebruikt wordt voor celsynthese.

Bij een toereikende zuurstofvoorziening wordt de grootte van de populatie vooral bepaald door de volume-/slibbelasting en de daaraan gekoppelde sibleeftijd. De populatie is maximaal bij een slibbelasting van circa 0,3 kg BZV/kg d.s.-dag (orde van grootte: 10^3 - 10^4 cellen per ml). Bij lagere belastingen zijn minder bacteriecellen beschikbaar (vlok steviger en relatief minder aanvoer met het influent), waardoor de ciliatenpopulatie kleiner is. Bij hogere slibbelastingen wordt de sibleeftijd zo kort dat de relatief traaggroeiende ciliaten zich niet meer in het slib kunnen handhaven.

Aantallen van duizenden exemplaren per ml zijn heel suggestief en leiden gemakkelijk tot een overschatting van de bijdrage van de ciliaten aan het totale zuiveringsproces. De invloed van een bepaalde groep organismen wordt echter niet door het aantal bepaald, maar door de procentuele bijdrage aan de totale hoeveelheid biomassa in de installatie. Het gewicht van een aantal soorten die frequent in actiefslib voorkomen kan variëren van 0,1 ng tot 10 ng, met uitschieters tot 80 ng voor *Stentor roesili*, een 'reus' onder de ciliaten. Uitgaande van 1 ng en 5000 exemplaren/ml, en een totaal slibgehalte van 4 g/l, bestaat slechts 0,1% van de totale biomassa uit ciliaten. De feitelijke bijdrage van de ciliaten (en van de andere protozoën) aan het totale zuiveringsrendement is dan ook volstrekt ondergeschikt aan die van de bacteriën.

De ciliaten worden onderverdeeld in sessiele (= vastzittende), kruipende en vrijzwemmende soorten.

6.1.1.1 Sessiele ciliaten

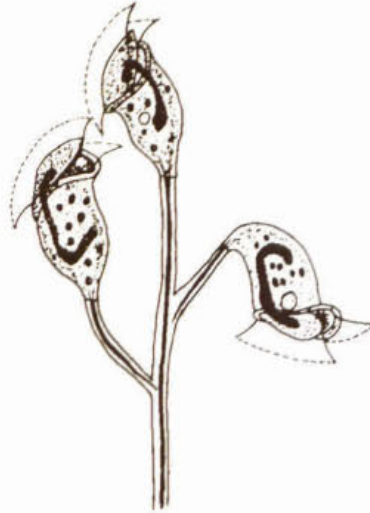
Bij de sessiele ciliaten is de cel veelal op een steel geplaatst die vaak aan een slibvlok vastzit. Bij sommige soorten zijn de stelen vertakt, waardoor kolonies van soms wel tientallen cellen zijn ontstaan.

Carchesium

Carchesium heeft "klokvormige" cellen. Deze hebben een doorsnede van 50-125 μm . Om de mondopening is een krans van ciliën aanwezig, de rest van het celoppervlak is "kaal".

De steel bevat een spier die samengetrokken kan worden. De stelen zijn meestal vertakt, waardoor kolonies zijn ontstaan. Deze kolonies kunnen een doorsnede van enkele mm's bereiken. Bij de vertakkingen is de spier in de steel onderbroken.

Carchesium sp. komen algemeen voor in actief-slib bij slibbelastingen kleiner dan circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag



Epistylis

Epistylis heeft enigszins vaasvormige cellen. Deze hebben een diameter van 70 à 100 μm . De steel is meestal vertakt, waardoor kolonies zijn ontstaan, maar bevat geen spier. De stelen kunnen zich dus niet samentrekken (de cel wel). Kolonies kunnen macroscopische afmetingen bereiken (mm's).

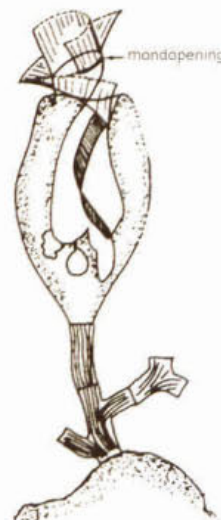
Epistylis sp. komen algemeen voor in actief-slib, vooral bij slibbelastingen van 0,1 à 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag.



Opercularia

Opercularia heeft enigszins klokvormige cellen. Deze hebben een diameter van ongeveer 140 μm . De stelen zijn vertakt waardoor kolonies zijn ontstaan. In de steel is geen spier aanwezig, waardoor deze zich niet kan samentrekken. In vergelijking met de andere sessiele ciliaten heeft *Opercularia* een kleine mondopening

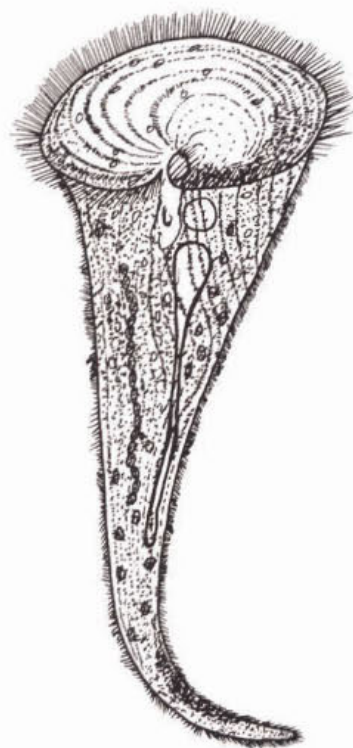
Opercularia sp. komen vooral bij wat hogere slibbelastingen voor (0,2 à 0,3 kg BZV/kg d.s.-dag).



Stentor

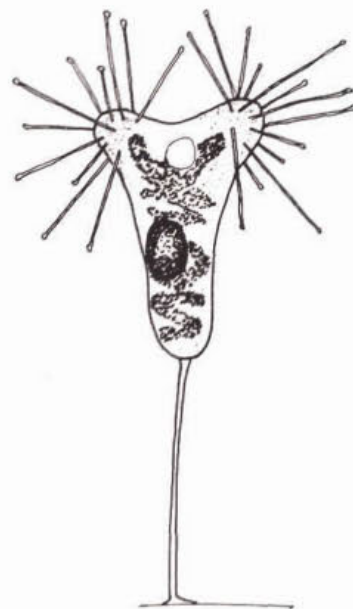
Stentor is een ciliaat met een zeer kenmerkende trompetvormige cel. Deze is meestal, maar niet altijd aan een slibvlok gehecht. Aan het brede uiteinde is een krans van ciliën aanwezig voor het transport van water plus voedseldeeltjes naar de mondopening. De lengte van de cellen kan variëren van 150 tot 500 μm . Het is dus een grote ciliaat. Een steel ontbreekt.

Stentor wordt voornamelijk waargenomen onder oxydatieslootcondities, dus bij zeer lage slibbelastingen.



Suctoriën

Suctoriën zijn ciliaten. Op volwassen cellen ontbreken de ciliën echter. Deze verdwijnen zodra de cel een steel vormt waarmee het organisme zich aan een oppervlak, b.v. een actief-slibvlok, hecht. Volwassen exemplaren zijn dus sessiel. Op het celoppervlak is een aantal, zeer kenmerkende, kaarsrechte tentakels aanwezig. Deze zijn dikker dan de rechte schijnvoetjes van de zonnediertjes. Bij de meeste suctoriën is aan het uiteinde van alle tentakels een klein knopje aanwezig. Dit is een soort mond, waarmee gevangen protozoën, het belangrijkste voedsel van suctoriën, worden leeggezogen. Afhankelijk van het soort, kunnen zowel ronde als vaasvormige cellen in actiefslib worden waargenomen. In actiefslib hebben de cellen meestal een lengte van 50 à 100 μm .



Suctoriën worden regelmatig in actiefslib waargenomen. De populatie is echter altijd klein.

Vaginicola

Vaginicola is een sessiele ciliaat met een trompetvormige cel. Deze is 'gehuisvest' in een opvallende, transparante trechter. Vaak zijn in zo'n trechter twee cellen aanwezig. De cel kan zich samentrekken, waardoor deze volledig in de trechter verdwijnt. Op de 'kop' van de cel is een krans ciliën aanwezig, waarmee water plus voedseldeeltjes naar de mondopening getransporteerd worden. De cel heeft een lengte van circa 100 µm.

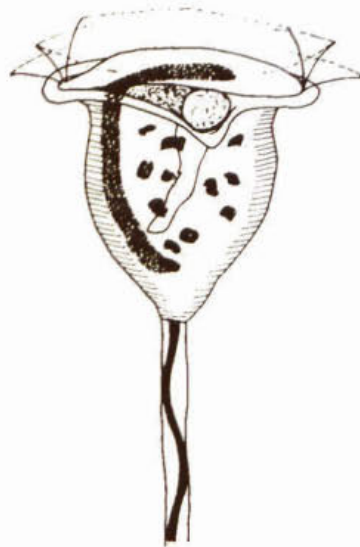
Vaginicola wordt voornamelijk waargenomen bij lage slibbelastingen (oxydatieslootcondities).



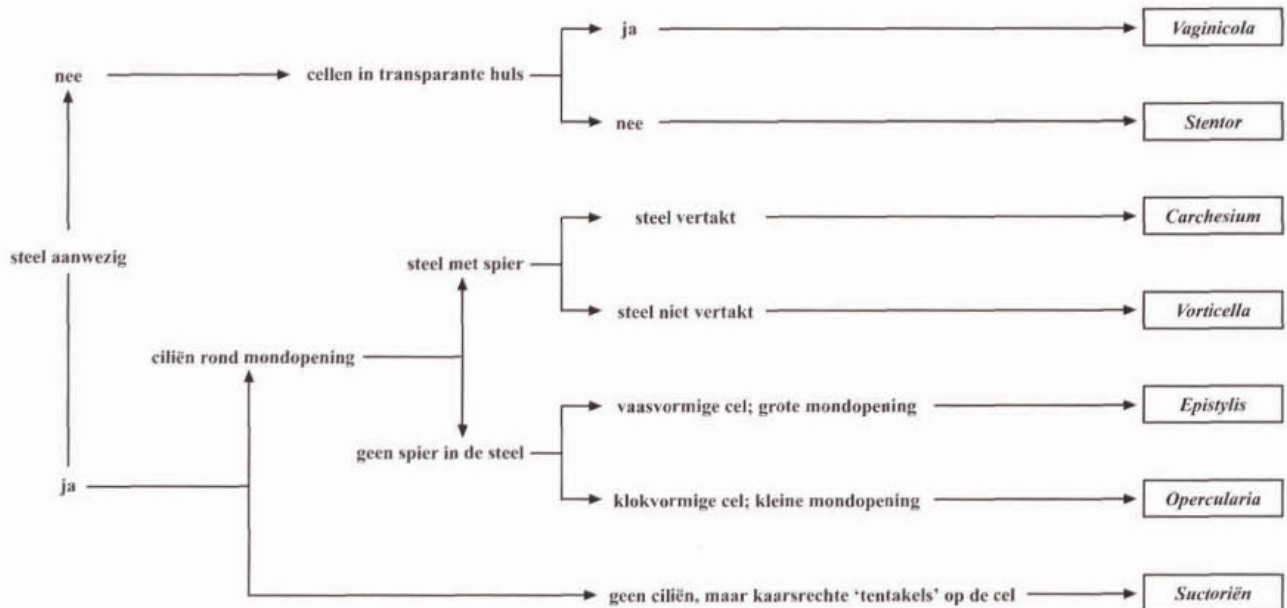
Vorticella

Vorticella is een sessiele ciliaat met cellen van 50 tot 150 µm. Deze hebben enigszins de vorm van een klok. Rond de mondopening is een krans van ciliën aanwezig, waarmee het organisme water (met voedseldeeltjes) naar de mondopening kan laten stromen. De steel is nooit vertakt; het zijn dus solitaire organismen. In de steel is een spier aanwezig die samengetrokken kan worden.

Vorticella sp. komen zeer algemeen voor bij slibbelastingen < circa 0,4 kg BZV/kg d.s./dag.



In figuur 68 is een determinatie-schema weergegeven voor het onderscheiden van deze sessiele ciliaten.



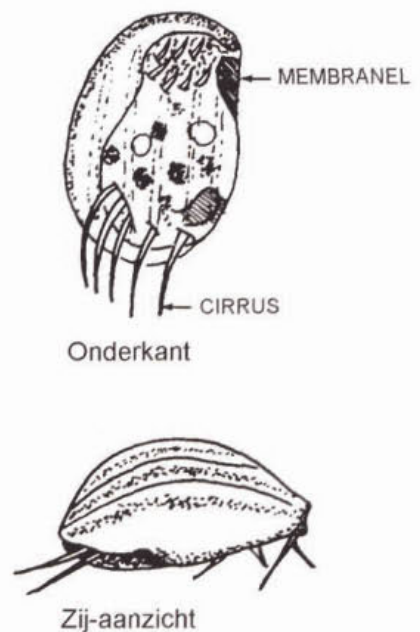
Figuur 68 Determinatieschema voor gangbare, sessiele ciliaten.

6.1.1.2 Kruipende ciliaten

De vertegenwoordigers van deze groep 'kruipen' over de slibvlokken en begrazen deze daarbij aan de buitenkant. Zo worden bacteriecellen verwijderd die niet stevig aan de vlokken zijn gebonden.

Aspidisca

Aspidisca is een ciliaat die vaak met grote snelheid over de vlokken kruipt. Van boven af gezien is de cel rond, het zijaanzicht is meer ovaalvormig. Een duidelijke mondopening ontbreekt. Op de "rug" zijn vijf ribbels aanwezig. De ciliën staan niet afzonderlijk op het lichaam ingeplant, maar zijn als cirri aanwezig. Dit zijn bundeltjes ciliën die puntig toelopen en er als een soort pootjes uitzien. Er zijn zeven cirri aan de front-buikzijde en vijf of meer aan de achterkant van de cel. Daarnaast vormen de ciliën ook membranellen ("stroken" van aan elkaar gekleefde ciliën). De grootte van de diverse *Aspidisca* soorten kan variëren van 30 tot 50 μm , de zeer gangbare *Aspidisca costata* heeft



een diameter van 30 μm .

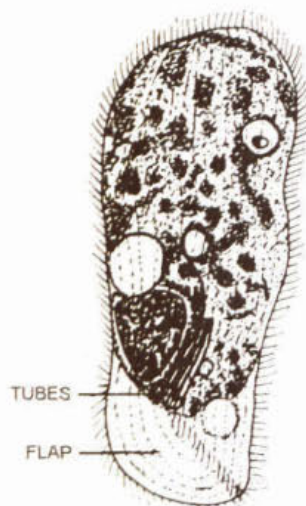
Aspidisca lijkt op *Euplotes*. Laatstgenoemde ciliaat is echter groter (30-100 μm) en kruipt niet over de vlokken.

Aspidisca komt zeer algemeen voor. Mits de belasting niet al te hoog is (< circa 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag), kan deze ciliaat in vrijwel ieder actiefslib worden waargenomen.

Chilodonella

Chilodonella is een kruipende/grazende ciliaat, met een bijna transparante flap aan de voorkant als belangrijk kenmerk. Deze krult vaak op als het organisme over de vlok kruipt. Van de zijkant gezien, is deze platte flap ook duidelijk als zodanig herkenbaar. De mondopening is omgeven door een uitstulping in de vorm van een korte tubus. De lengte van de cellen kan variëren van 40 tot 125 μm .

Chilodonella sp. komen algemeen voor bij slibbelastingen < circa 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag.



Trachelophyllum

Trachelophyllum soorten worden gekenmerkt door hun platte, langgerekte cellen, die helemaal bedekt zijn met ciliën. De ciliën zijn rond de mondopening langer en op een karakteristieke manier gerangschikt (gebogen 'snorharen'). *Trachelophyllum* zwemt meestal snel door het water tussen de vlokken, maar kan ook kruipend over de vlokken worden waargenomen. De meest gangbare vertegenwoordiger van dit soort is *Trachelophyllum pusillum*. Deze heeft een cel-lengte van 30 à 50 μm .

Trachelophyllum is een zeer gangbare ciliaat bij slibbelastingen kleiner dan circa 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag.

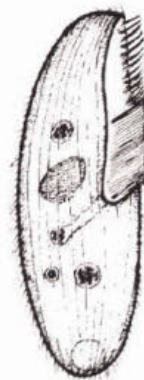


6.1.1.3 Vrij-zwemmende ciliaten

Zoals de naam al aangeeft, zwemmen deze ciliaten in het water tussen de vlokken. De snelheid waarmee ze zich bewegen is sterk variabel.

Blepharisma

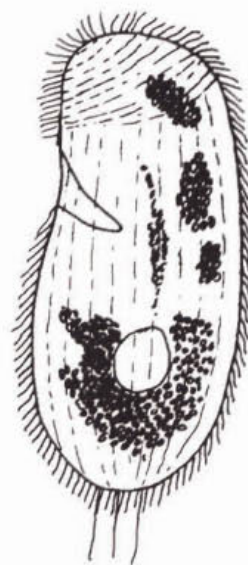
De (licht-)roze cellen van *Blepharisma* zijn zeer kenmerkend. Deze vrij-zwemmende ciliaat heeft enigszins ovale cellen met een lengte van circa 200 μm . Bij de mondopening is een zone met stroken van relatief lange ciliën aanwezig. Hiermee wordt water met voedseldeeltjes naar de mondopening getransporteerd.



Blepharisma wordt voornamelijk waargenomen bij wat hogere slibbelastingen (0,1-0,4 kg BZV/kg d.s.:dag).

Colpidium

Colpidium is een vrij-zwemmende ciliaat met een enigszins boonvormige cel. Het celoppervlak is bedekt met ciliën; aan de achterkant zijn enkele lange trilhaartjes aanwezig. De zone rond de mondopening is ingestulpt. De meest gangbare vertegenwoordiger van dit soort (*Colpidium colpoda*) heeft een cellengte van circa 100 μm .



Colpidium word minder frequent waargenomen dan de andere vrij-zwemmende ciliaten. Deze ciliaat komt waarschijnlijk hoofdzakelijk voor bij slibbelastingen van 0,1 tot 0,4 kg BZV/kg d.s.:dag

Euplotes

Euplotes is een vrij-zwemmende ciliaat met ovale cellen. De ciliën zijn aan elkaar gekleefd tot cirri. Aan de voor- en achterkant zijn respectievelijk negen en vijf cirri aanwezig. Deze fungeren als een soort pootjes. Er is tevens een karakteristieke strook van aan elkaar gekleefde ciliën op de cel aanwezig, waarmee voedseldeeltjes naar de mondopening getransporteerd worden. Op de bovenkant van de cel zijn zes 'ribbels' aanwezig. De grootte van de diverse soorten kan variëren van 30 tot 100 µm.

Euplotes lijkt op *Aspidisca*, maar is meestal groter en vrij-zwemmend.



Euplotes komt algemeen voor in actiefslib, vooral bij slibbelastingen van 0,1 à 0,2 kg BZV/kg d.s.-dag.

Litonotus (Lionotus)

De cellen van *Litonotus* hebben de vorm van een fles (amphora). De hals, die ongeveer even lang is als de rest van de cel, is enigszins gebogen. De totale cellengte is circa 100 µm. De ciliën aan de buitenkant van de gebogen hals zijn langer dan die op de rest van het celoppervlak. *Litonotus* beweegt meestal op een 'elegante' manier door het water.

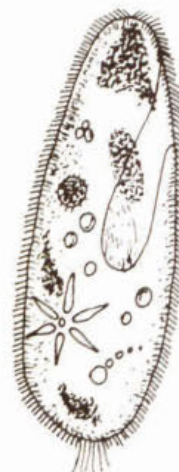
Litonotus komt algemeen voor in actiefslib, vooral bij slibbelastingen van 0,1-0,2 kg BZV/kg d.s.-dag.



Paramecium

Paramecium is een vrij-zwemmende ciliaat waarvan de cellen enigszins op een pantoffel lijken; vandaar ook de naam 'pantoffeldiertje'. Het is een grote ciliaat; de cellengte kan variëren van 180 tot 300 µm. Het celoppervlak is bedekt met ciliën. De celkern is groot en meestal duidelijk zichtbaar. De samentrekbare, stervormige vacuole is zeer karakteristiek.

Paramecium wordt vooral waargenomen bij slibbelastingen van 0,1-0,3 kg BZV/kg d.s.-dag.



Spirostomum

Spirostomum heeft een uitgesproken langwerpige, flexibele cel. Deze is bedekt met ciliën, terwijl aan het uiteinde een kenmerkende vacuole aanwezig is. *Spirostomum* zwemt meestal snel door de vloeistof tussen de vlokken. Het is de grootste ciliaat in actiefslib; de cellengte kan variëren van 500 tot 900 µm.

Spirostomum komt algemeen voor in actiefslib, vooral in installaties met een slibbelasting kleiner dan circa 0,2 kg BZV/kg d.s.·dag.



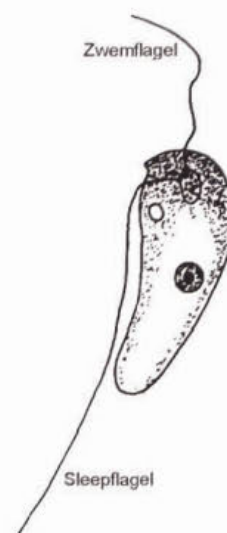
6.1.2 Flagellaten

De flagellaten ontleen hun naam aan het bezit van één of meer (meestal niet meer dan acht) flagellen. Deze flagellen zijn langer dan de trilharen van de ciliaten. Door de snelle beweging, zijn de flagellen echter vaak niet duidelijk te zien. De flagellen dienen voor de beweging van de cel. Sommige soorten bezitten een monddopening waardoor ze voedseldeeltjes kunnen opnemen. Andere typen nemen opgeloste voedingsstoffen via de celwand op. De meeste flagellaten zijn aanmerkelijk kleiner dan de ciliaten. Voor het bekijken moet daarom een 40 x objectief worden gebruikt.

Bodo

Bodo is een vrij-zwemmende flagellaat die zich op een kenmerkende schoksgewijze manier voortbeweegt. Er zijn twee flagellen aanwezig: een zwemflagel aan de voorkant en een sleepflagel aan de achterkant. De flagellen zijn langer dan de ovale cel. Op de plaats waar de flagellen zijn ingeplant, is de celwand ingestulpt. De flagellen zijn niet altijd duidelijk zichtbaar. De cellen hebben een lengte van circa 15 µm.

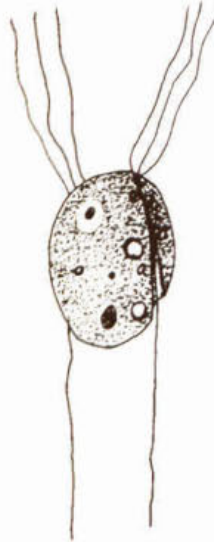
De aanwezigheid van *Bodo* sp. duidt op een hoge slibbelasting (> circa 0,4 kg BZV/kg d.s.·dag) en/of gebrek aan zuurstof.



Hexamitus

Hexamitus is een vrij-zwemmende flagellaat die snel, in een rechte lijn door het water beweegt (niet roterend zoals *Trepomonas*). Aan de voorkant zijn twee x drie flagellen aanwezig, aan de achterkant twee sleepflagellen. De cel is enigszins ovaalvormig en heeft een diameter van circa 20 µm.

De aanwezigheid van *Hexamitus* duidt op een hoge slibbelasting (> circa 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag) en/of gebrek aan zuurstof.



Peranema

Peranema is een vrij-zwemmende flagellaat met een zeer kenmerkende, lange, dikke flagel. Er is nog een tweede, veel dünnere (sleep)flagel aanwezig, maar deze is nauwelijks zichtbaar. Bij het zwemmen van de cel beweegt alleen het uiteinde van de flagel. De cellengte bedraagt meestal 20 à 30 µm.

Deze flagellaat wordt regelmatig in actiefslib waargenomen. In tegenstelling tot de meeste andere flagellaten, duidt de aanwezigheid van *Peranema* niet op specifieke procesomstandigheden zoals een hoge slibbelasting of zuurstofgebrek.



Monosiga

De cel is bolvormig tot ovaal. Aan de "top" is een dunne kraag aanwezig waardoor de flagel naar buiten komt. *Monosiga* zit meestal vast aan een slibvlok. De cellen zijn 1-15 µm lang.

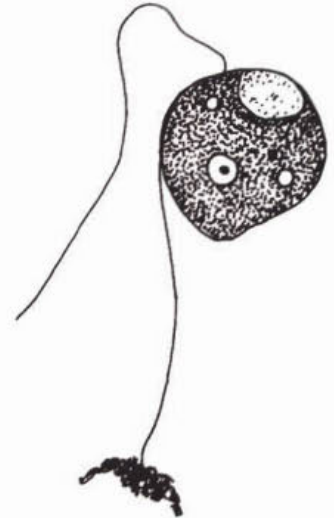
De aanwezigheid van *Monosiga* duidt op een hoge slibbelasting (> circa 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag) en/of gebrek aan zuurstof



Pleuromonas

Pleuromonas is een flagellaat met een kenmerkende, snelle springerige manier van bewegen. De cellen zijn meestal niet los in het water, maar gehecht aan slibvlokken aanwezig. Net als *Bodo*, heeft *Pleuromonas* twee flagellen; met de langste flagel is de cel gehecht aan de vlok. De cellen hebben een diameter van 5 à 10 µm.

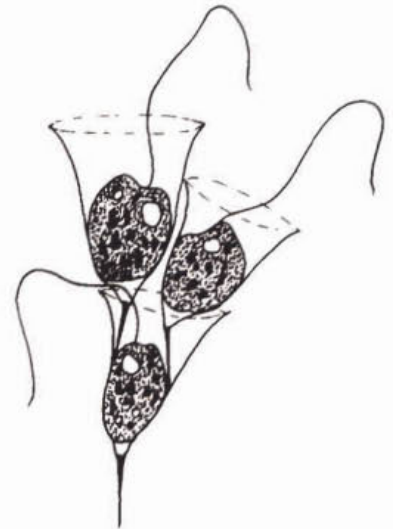
De aanwezigheid van *Pleuromonas* duidt op een hoge slibbelasting (> circa 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag) en/of gebrek aan zuurstof.



Poteriodendron

Poteriodendron is een flagellaat met als belangrijkste kenmerk dat deze kolonies van cellen vormt. De cellen zijn in transparante trechters 'gehuisvest'. Deze trechters zijn via stelen aan de onderkant met elkaar verbonden tot kolonies. De individuele cellen hebben een doorsnede van circa 20 µm. De cellen hebben een flagel waarmee ze zich in de trechter kunnen bewegen; ze kunnen deze echter niet verlaten.

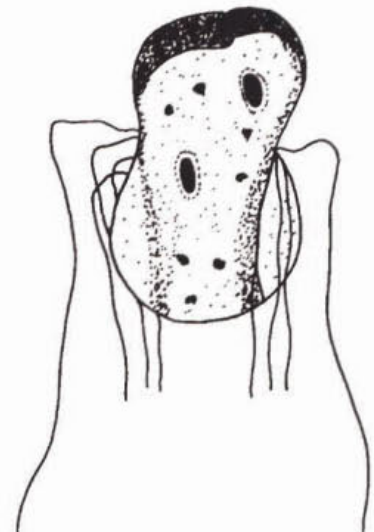
Poteriodendron kolonies worden regelmatig in actiefslib waargenomen. Het is niet bekend of deze flagellaat ook als indicator-organisme gebruikt kan worden.



Trepomonas

Trepomonas is een vrij-zwemmende flagellaat, die zich op een kenmerkende, roterende manier door het water beweegt. Vanaf de bovenkant gezien is de cel ovaalvormig, vanaf de zijkant afgeplat. De cellen hebben een lengte van circa 20 µm. *Trepomonas* bezit twee x vier flagellen die aan de zijkant van de cel zijn ingeplant. Naast twee lange (20 µm), zijn ook zes korte (8 µm) flagellen aanwezig.

De aanwezigheid van *Trepomonas* duidt op een hoge slibbelasting (> circa 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag) en/of gebrek aan zuurstof.



6.1.3 Amoeben, schaalamoeben en zonnediertjes

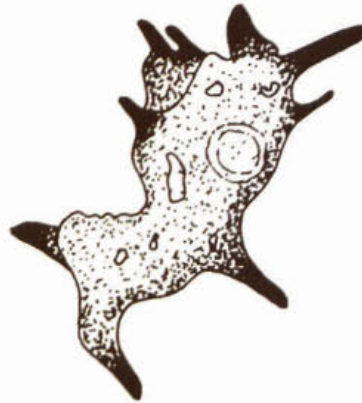
Deze organismen hebben gemeenschappelijk dat ze schijnvoetjes (= pseudopodiën) kunnen vormen. Deze schijnvoetjes zijn tijdelijke uitstulpingen van de celinhoud.

Amoeben

Amoeben zijn eencellige organismen met een flexibele celwand waardoor de vorm van de cel voortdurend kan veranderen. Zij nemen voedseldeeltjes (bacteriecellen, andere protozoën enz.) op door deze te omringen. Dit lijkt dus al wat op voedselopname door een mondopening. De grootte van de verschillende soorten varieert van 50 tot 400 micrometer. Amoeben kunnen dus zo groot worden als een slibvlok. Door hun structuur lijken ze soms op een slibvlok.

Uitzonderingsgevallen daargelaten, bewegen amoeben zich uiterst langzaam (met pseudopodiën).

Amoeben zijn karakteristiek voor wat hogere slibbelastingen (0,1-0,4 kg BZV/kg d.s.·dag) en/of zuurstoftekorten. In laagbelaste systemen met een vergaande nutriëntenverwijdering worden ze daarom slechts zelden waargenomen.



Schaalamoeben

Bij deze groep amoeben is de cel omgeven door een soort pantser (schaal). Hierin is een opening aanwezig waardoor de schijnvoetjes naar buiten kunnen komen. Deze schijnvoetjes zijn overigens slechts zelden zichtbaar in een microscopisch preparaat. De vorm van de schaal (rond, beker-vormig, enz.) hangt van het soort af.

Arcella is een schaalamoeba met een, van boven af gezien, ronde schaal. Het zijaanzicht lijkt op de kop van een paddestoel. De schaal heeft een duidelijk waarneembare structuur. De schaal is in beginsel praktisch transparant, maar is in actief-slib, door precipitatie van ijzerverbindingen op het oppervlak, meestal geelbruin gekleurd. De ronde opening aan de onderkant van de schaal is erg karakteristiek.

De structuur van de schaal van *Euglypha* lijkt veel op die van een honingraat. De grootte van de diverse schaalamoeben kan variëren van 30 tot 200 μm .

In laagbelaste actiefslib zijn bijna altijd, en vaak in grote aantallen, schaalamoeben aanwezig. *Arcella* is de meest gangbare soort. Deze komt vooral voor onder nitrificerende condities.

Zonnediertjes (Heliozoën)

Zonnediertjes behoren tot de amoeben. Ze hebben bolvormige cellen, welke omgeven zijn door naalddunne, kaarsrechte schijnvoetjes. Deze zijn intrekbaar. De pseudopodiën worden niet gebruikt voor het voortbewegen van de cel, maar om bacteriën en protozoën te vangen. Organismen die geraakt worden door de schijnvoetjes worden 'verlamd', waarna ze door het zonnediertje geconsumeerd worden. De celdiameter kan van 40 tot 100 μm variëren.

Zonnediertjes worden voornamelijk in laagbelaste actiefslibben waargenomen. De populatie is meestal klein.

ARCELLA
bovenaanzicht



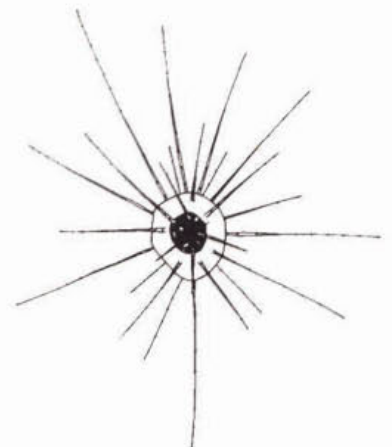
ARCELLA
zijaanzicht



DIFFLUGIA



EUGLYPHA



6.2 Metazoën

In tegenstelling tot bacteriën en protozoën, zijn metazoën meercellige micro-organismen. Het zijn dus 'hogere' organismen. De grootte van de diverse soorten kan variëren van 100 µm tot soms wel 1-2 cm. De meeste metazoën voeden zich met losse bacteriecellen of minieme vlokdeeltjes, er zijn echter ook soorten die slibvlokken kunnen opeten.

De volgende groepen kunnen in actiefslib aanwezig zijn:

- Rotiferen
- Nematoden
- Wormen
- Beertjes

Metazoën spelen in actief-slibinstallaties, uitzonderingsgevallen daargelaten, een ondergeschikte rol. Ze worden voornamelijk bij slibbelastingen kleiner dan circa 0,15 kg BZV/kg d.s.-dag waargenomen. Voor het registreren van het aantal metazoën wordt een schaal variërend van 0 (= afwezig) tot 3 (= tientallen organismen/preparaat) gebruikt.

6.2.1 Rotiferen

De rotiferen of raderdiertjes zijn relatief grote, duidelijk beweeglijke, langgerekte, meercellige organismen. De lengte van het lichaam kan variëren van 100-500 µm. Het lichaam is omgeven door een soort pantser waarin de kop en de staart kunnen worden teruggetrokken. Op de kop van het organisme staan enkele bundels trilharen. Hiermee kan een waterstroming richting mondopening worden gecreëerd. Ze hebben rond hun mondopening een soort kaken waarmee ze deeltjes, die ze uit het water filtreren, kunnen kraken. Deeltjes > ca. 10 µm kunnen deze mondopening echter niet passeren. Rotiferen eten dan ook voornamelijk losse bacteriecellen en kleine vlokdeeltjes.

De staart is op een karakteristieke manier vertakt en speelt een belangrijke rol bij het bewegen van de cel. Hiermee zet het raderdiertje zich namelijk eerst vast, waarna het lichaam gestrekt wordt. Vervolgens laat de staart los, de kop blijft op zijn plaats en het 'achterlijf' wordt bijgetrokken. Deze manier van voortbewegen lijkt op de wijze waarop een slak zich verplaatst.

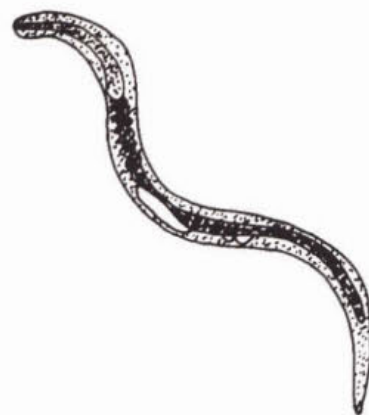
Rotiferen komen algemeen voor in laagbelast actiefslib. In communale installaties is de popu-



latie vrijwel altijd zeer beperkt van omvang, in slibben uit installaties bij de agro-industrie zijn soms wel grote aantallen rotiferen aanwezig.

6.2.2 Nematoden

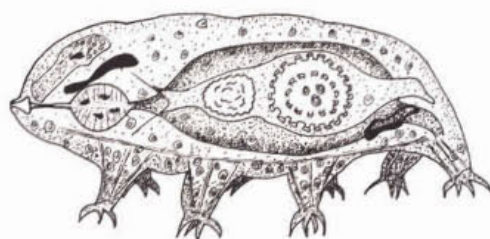
Nematoden of aaltjes hebben een langgerekt, cilindrisch lichaam, dat zeer flexibel is. De uiteinden van dit meercellige organisme zijn dunner dan het centrale deel. De lengte van de cellen kan variëren van 0,5 mm tot 3 mm. Ze zijn dus groter dan de meeste protozoën. Ze eten voornamelijk losse bacteriecellen en minieme vlokdeeltjes. Ze slokken/zuigen voedseldeeltjes op via contractie van de slokdarm. Omdat ze geen 'kaken' hebben en hun mondopening klein is, kunnen ze intacte vlokken niet opeten. De uiterst beweeglijke cellen zijn soms lastig 'in beeld' te houden bij het microscopisch onderzoek. De nematoden zijn overigens vaak in de vlokken 'weggekropen' en komen dan pas na verloop van tijd tevoorschijn.



Nematoden worden regelmatig waargenomen in laagbelast actiefslib, maar de populatie is praktisch altijd heel klein. Het is niet bekend of nematoden ook als indicator voor bepaalde procesomstandigheden gebruikt kunnen worden.

6.2.3 Beertjes

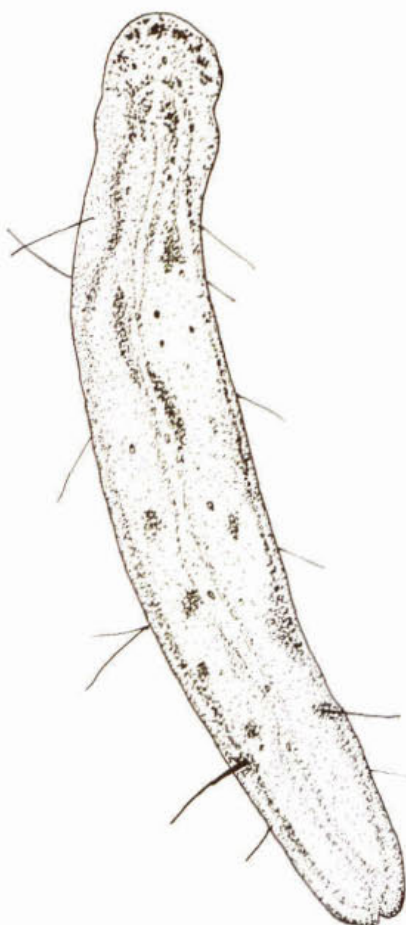
Dit is een meercellig organisme met een zeer opvallende vorm. Een beertje heeft een soort poten met klauwtjes, waarmee het meestal over de vlokken kruipt en deze begraast. Los in de waterfase beweegt dit organisme vaak wat onbeholpen. De grootte kan variëren van 200 tot 1200 μm .



Beertjes worden incidenteel waargenomen bij slibbelastingen $< 0,1 \text{ kg BZV/kg d.s. dag}$.

6.2.4 Wormen

Wormen zijn de grootste (micro-) organismen die bij het microscopisch onderzoek van actiefslib worden waargenomen. Met een diameter van circa 0,1 mm en een lengte van soms wel 1-2 cm zijn ze zeer opvallend aanwezig in een waterpreparaat. Het betreft vrijwel altijd borstelwormen; vaak *Nais elingius*, maar soms ook *Aelosoma sp.*. Wormen zijn in staat om slibvlokken of delen van vlokken op te eten. Een bloei van wormen (10^5 wormen/l) gaat dan ook gepaard met een vermindering van de slibproductie.



De groei van wormen in actiefslib is door nogal wat vraagtekens omgeven. Ze groeien niet extreem traag; onder optimale omstandigheden hebben ze een generatietijd van enkele dagen. Er lijkt, in de vorm van slibvlokken, ook meer dan voldoende voedsel aanwezig te zijn. Men zou dus in bijna alle installaties veel wormen verwachten. Desondanks worden ze bij lage slibbelastingen (oxydatieslootcondities) niet vaak waargenomen. Slibben met veel wormen zijn vaak afkomstig uit installaties met een slibbelasting van circa 0,1 kg BZV/kg d.s.-dag en waar het influent voorbezonden wordt. Een duidelijk verband tussen hun 'komen en gaan' en de procesomstandigheden ontbreekt meestal.

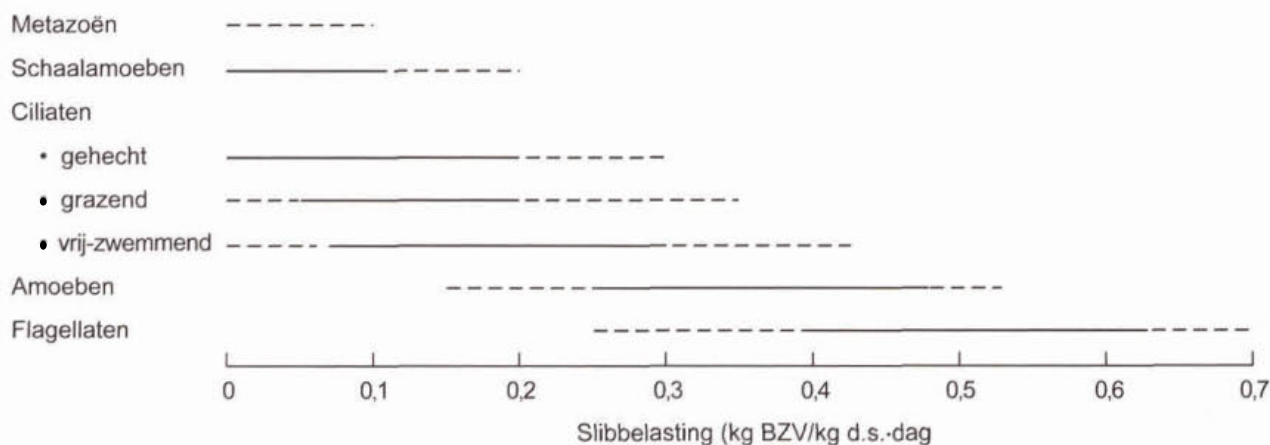
6.3 Indikatorfunctie

Men kan een nieuwe actief-slibinstallatie starten door de rioolwatertoevoer en de beluchting aan te zetten. In de aërietetank ontstaan vervolgens spontaan actief-slibvlokken. Deze worden in de nabezinktank afgescheiden en weer naar de beluchtingsruimte gepompt. Door voortdurend nieuw rioolwater toe te voeren en effluent te lozen, zonder dat slib aan het systeem wordt onttrokken, kan het gewenste gehalte aan biomassa binnen enkele weken opgekweekt worden. Tijdens de startperiode daalt de slibbelasting voortdurend en stijgt het zuiveringsrendement.

Simultaan vindt een verschuiving binnen de protozoënpopulatie plaats; er is in feite sprake van een karakteristieke opeenvolging van soorten. Tijdens de eerste dagen zijn zeer veel losse bacteriecellen aanwezig ($\Delta 10^8$ cellen/ml) en worden tevens de met het rioolwater aangevoerde verbindingen nog niet volledig door de bacteriële biomassa verwerkt. Er is sprake van een overmaat aan voedsel voor flagellaten en amoeben, die zich dan ook massaal ontwikkelen. Na enkele dagen verschijnen echter predatoren in de vorm van vrij-zwemmende ciliaten. Het aantal flagellaten en amoeben neemt vervolgens sterkt af, waaraan ook de intussen fors toegenomen concurrentie door de bacteriën in de vlokken sterk bijdraagt. Door de stijging van het slibgehalte, daalt de slibbelasting tijdens zo'n opstartperiode immers voortdurend. Voedselschaarste leidt daarna automatisch tot een afname van de groeisnelheid van de vrij-zwemmende ciliaten. Veel soorten verdwijnen zodra hun verdubbelingstijd de hydraulische verblijftijd in de aëratietank overtreft. In dit stadium verschijnen de ciliaten die aan slibvlokken zijn gehecht (b.v. *Vorticella*) of over de vlokken kruipen (b.v. *Aspidisca*) en die daardoor niet gemakkelijk uitspoelen. Dit verklaart de dominantie van gehechte en kruipende soorten bij lage slibbelastingen. Bij 'hoge' slibleeftijden verschijnen uiteindelijk ook schaal-amoeben en soms metazoën. In dit stadium is sprake van een hoog zuiveringsrendement, incl. een vergaande nitrificatie. Het aantal niet-vlokgebonden bacteriecellen is nu kleiner dan 10^6 /ml.

Er groeien dus andere soorten naarmate het zuiveringsrendement stijgt. Dit gegeven kan men ook in omgekeerde zin gebruiken: de aanwezigheid van bepaalde soorten zegt iets over de zuiveringsresultaten en de procesomstandigheden.

Het verband tussen de slibbelasting en de populatiesamenstelling is in figuur 69 schematisch weergegeven. Bij het microscopisch slibonderzoek moet worden gecontroleerd of de aanwezige soorten karakteristiek zijn voor de belasting van de installatie. Bij niet te hoge slibbelastingen horen hoofdzakelijk ciliaten, schaal-amoeben en soms wat metazoën aanwezig te zijn. Zuurstoftekort in een laagbelaste installatie leidt tot een afname van de verwerkingssnelheid van het CZV en gaat daarom gepaard met een verschuiving binnen de populatie richting flagellaten en amoeben.



Figuur 69 Effect van de slibbelasting op het voorkomen van protozoën en metazoën (geen zuurstofgebrek).

Als protozoën en metazoën abrupt verdwijnen, zijn in het influent toxische componenten aanwezig. Zo'n vergiftiging kan binnen enkele dagen worden gevolgd door een explosieve toename van het aantal protozoën, omdat het aantal losse bacteriecellen tijdens hun afwezigheid sterk is toegenomen.

Een sterke toename van het aantal wormen in actiefslib kan tot een afname van de surplus-slibproductie leiden (zie par. 9.7).

7 Conclusies slibonderzoek

Microscopisch slibonderzoek dient uit te monden in een uitspraak over de kwaliteit van het actiefslib. Hierbij gaat het om de keuze tussen goed, matig of slecht. Bij het vaststellen van de slibkwaliteit worden de conclusies inzake vlok morfologie, populatie van draadvormers, enz. geïntegreerd tot een eindoordeel. Dit is niet zo eenvoudig, omdat in feite appels en peren vergeleken worden. De diverse aspecten zijn ook niet van gelijk gewicht; een hoge filament-index is bijvoorbeeld problematischer dan veel losse cellen. In tabel 3 is aangegeven hoe zwaar de diverse criteria wegen bij de beoordeling. Als slechts één aspect met matig en de rest met goed beoordeeld wordt is de overall slibkwaliteit goed. Twee à drie kwalificaties met "matig" leiden tot een eindoordeel van eveneens matig. De slibkwaliteit is slecht bij hogere scores in de kolom matig, of als aspecten rechtstreeks met "slecht" beoordeeld worden.

Tabel 3 Criteria voor het vaststellen van de slibkwaliteit.

	Goed	Matig	Slecht
Filament Index	< 3	3 - 4	4 - 5
Losse cellen	0 - 1	2 - 3	≥ 3
Spirillen	-	1	≥ 2
Ciliaten/Schaalamoeben	≥ 1	< 1	0
Flagellaten/Amoeben	0	1 - 2	≥ 3
% vlokken > 25 µm	> 80 à 90	> 50 à 70	< 50
Vlokstructuur	compact	open	open
'Stevigheid' vlok	stevig	los	los
Vorm vlok	afgerond	onregelmatig	onregelmatig

N.B. Bij sommige installaties is een matige/slechte kwaliteit inherent aan het ontwerp.

8 Het actief-slibproces

8.1 Basis: toepassen en versnellen van natuurlijke kringloopprocessen

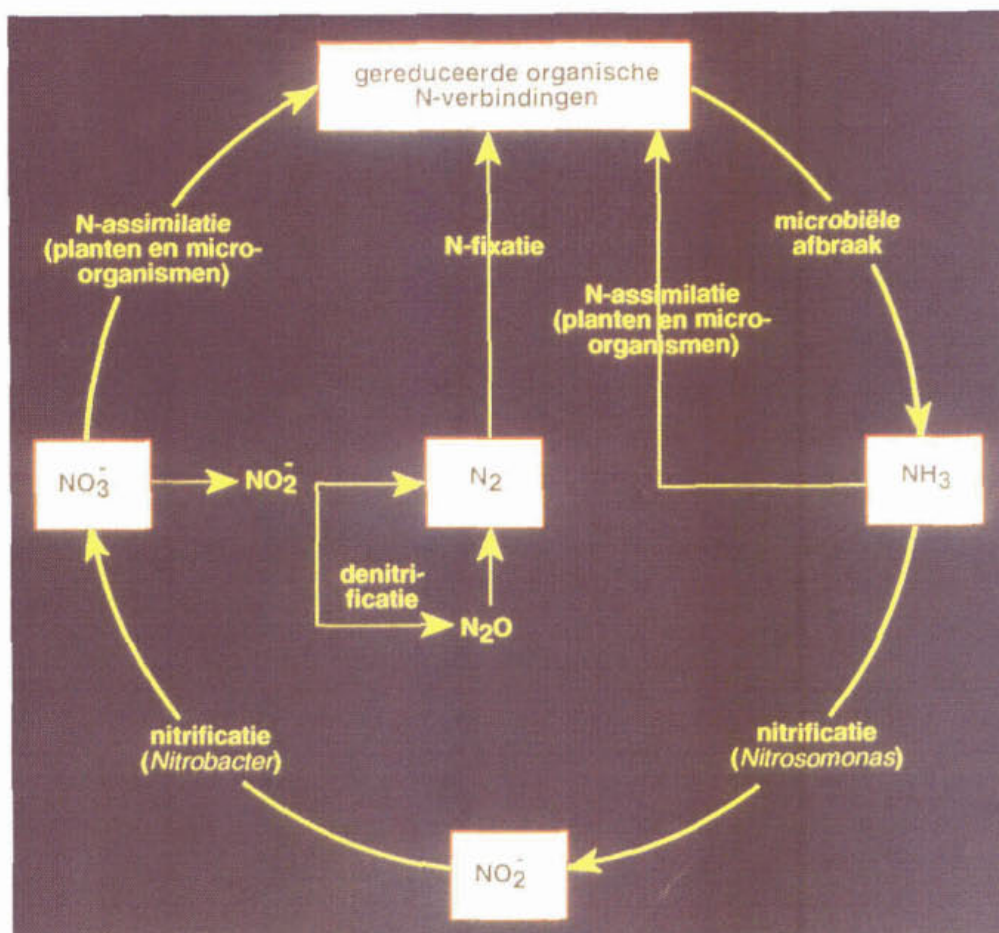
De processen die in biologische waterzuiveringsinstallaties plaatsvinden zijn afgeleid van natuurlijke materiekringlopen. De zon vormt de motor van deze kringlopen. Voor groei/synthese is altijd energie nodig. Algen, planten en bomen gebruiken zonne-energie om te groeien (fotosynthese). Ze nemen elementen als stikstof, fosfor en zwavel op uit de grond of uit het water. Samen met de koolstof uit het CO_2 in de atmosfeer worden deze elementen verwerkt tot de organische bouwstenen waaruit algen, planten en bomen zijn opgebouwd. Het gevormde celmateriaal kan vervolgens als voedsel (energie) dienen voor mens en dier, die op hun beurt soms weer door andere organismen geconsumeerd worden.

Alle leven is echter eindig. Vroeg of laat resteert alleen nog dood organisch materiaal, met daarin 'opgesloten' elementen. Iedereen weet dat bladeren, maar ook hele boomstammen en dode dieren na verloop van tijd verdwijnen. Voor dit afbraakproces is een legioen micro-organismen verantwoordelijk, met name bacteriën en schimmels. De in het organisch materiaal opgenomen elementen (C, N, P, S, enz.) komen bij dit afbraakproces weer vrij (= mineralisatie) en kunnen vervolgens opnieuw door fotosynthetische organismen gebruikt worden. Hiermee is de kringloop gesloten. Recycling van elementen in natuurlijke materiekringlopen is al zo oud als de wereld. In figuur 70 is als voorbeeld de stikstofkringloop weergegeven.

Talloze micro-organismen zijn dus van nature betrokken bij de afbraak van organisch materiaal. Zij doen dit omdat dood, organisch materiaal hun enige voedselbron vormt. Micro-organismen hebben, net als alle andere levende wezens, voortdurend energie nodig voor hun levensprocessen. Om hierin te voorzien worden de beschikbare organische verbindingen ten dele afgebroken. Dit levert energie op, die benut wordt om het resterende deel van het voedsel om te zetten in celcomponenten. Dit omvat:

- vervanging van defecte celbestanddelen;
- vorming van reservestoffen om in perioden met weinig voedselaanbod te kunnen overleven. De hoeveelheid reservestoffen die opgeslagen kan worden is overigens afhankelijk van het soort organisme;
- vorming van nieuwe cellen, mits voldoende voedsel beschikbaar is. Bij de zuivering van afvalwater vinden we deze groei terug in de vorm van surplus- of spuislib.

Overigens zijn er ook micro-organismen die energie halen uit de omzetting van anorganische verbindingen. De nitrificerende bacteriën (zie figuur 70) vormen hiervan een bekend voorbeeld.



Figuur 70 De stikstofkringloop.

In zijn te weinig micro-organismen aanwezig om de afbraak/omzetting van (an)organische verbindingen snel en efficiënt te laten verlopen. Het actief-slibproces ondervangt dit bezwaar. Door in de installatie een grote hoeveelheid 'voorgekweekte' biomassa te handhaven, kan de afbraak versneld en onder gecontroleerde omstandigheden worden uitgevoerd.

8.2 Vorming van actief-slibvlokken

Beluchten van afvalwater leidt na verloop van tijd spontaan tot de vorming van vlokjes biomassa. Deze bezinken zodra de beluchting wordt stopgezet. Na verwijdering van de bovenstaande vloeistof, waarvan de verontreinigingsgraad aanzienlijk is gedaald, kan het bezonken slib gebruikt worden voor de behandeling van een nieuwe portie afvalwater. De hoeveelheid bezinkbaar materiaal neemt daarbij verder toe en het zuiveringsproces verloopt sneller. Op deze ontdekking (eind negentiende eeuw) is het actief-slibproces gebaseerd.

De volgende processen vinden plaats tijdens het beluchten van het afvalwater, waarin 'van nature' meestal al veel bacteriën aanwezig zijn. Bij de start is de concentratie aan voedingsstoffen (= F) hoog. Aërobe bacteriën kunnen daardoor snel groeien en zich via celdeling gaan vermenigvuldigen. De hoeveelheid bio-

massa (= M) neem dus toe. Zowel de toename van M als de afname van F verlopen logaritmisch, de F/M-verhouding daalt daardoor snel tijdens het beluchten. Dit gaat door tot de voedingsstoffen opraken. Bij een lage F/M-verhouding gaan de cellen van veel bacteriesoorten 'aan elkaar kleven'. Er ontstaan conglomeraten van cellen; de zogenaamde actief-slibvlokken.

In actief-slibinstallaties worden de vlokken via bezinken van het effluent gescheiden. De bezonken biomassa wordt grotendeels teruggevoerd naar de beluchtingsruimte, waardoor hierin een lage F/M-verhouding gehandhaafd wordt. Dit is niet alleen nodig voor de vlokvorming, maar ook om het zuiveringsproces snel te laten verlopen. De groei van de biomassa wordt als surplusslib afgevoerd.

Bacteriën vormen dus vlokken om zich in voedselarme milieus te kunnen handhaven. Op deze manier wordt uitspoeling voorkomen. Vlokvorming biedt tevens bescherming tegen veel predatoren zoals protozoën, omdat deze niet in staat zijn delen van de vlok 'af te bijten'.

Vlokken worden steviger naarmate de slibbelasting (F/M-verhouding) lager is. Dit houdt verband met de in paragraaf 4.1 al genoemde relatieve toename van het aantal Gram-positieve bacteriesoorten in de vlok.

Vlokvorming is een gecompliceerd en een ten dele nog niet begrepen fenomeen. Van een aantal factoren is bekend dat ze een rol spelen bij het ontstaan van vlokken:

- veel bacteriën vormen slijmkapsels om hun cellen. Dit slijm, dat hoofdzakelijk uit polymere verbindingen bestaat, kit de cellen als het ware aan elkaar;
- bacteriën zijn negatief geladen. Positief geladen ionen, met name tweewaardige ionen zoals Ca^{2+} , dragen bij aan de koppeling van de cellen of van onderdelen van de vlok;
- sommige bacteriën vormen om de cel een netwerk van uiterst dunne draadjes (fibrillen). Ook dit netwerk draagt bij aan de koppeling van de cellen en het invangen van andere bacteriën en deeltjes.

8.3 Factoren die de samenstelling van actief-slibvlokken bepalen

Actief-slibvlokken zijn conglomeraten van:

- levende micro-organismen; voornamelijk bacteriecellen. Er zijn bijna altijd veel verschillende soorten aanwezig;
- afgestorven cellen. Het percentage dode cellen neemt toe naarmate de slibbelasting lager is;
- onverteerde organische brokstukken die ingevangen zijn door de vlok;
- zandkorreltjes en geprecipiteerde anorganische verbindingen zoals zouten. De grootte van deze fractie (de gloeirest) kan variëren van 10-60 (gewicht) %.

Hoe de vlok in een bepaalde installatie in feite is samengesteld, hangt sterk af van de procesomstandigheden. De belangrijkste procesomstandigheden worden in de paragrafen 8.3.1 t/m 8.3.5 toegelicht. Voorafgaande hieraan worden eerst drie biologische aspecten besproken.

Gemengde populatie

In een biologische zuiveringsinstallatie wordt een groot aantal verschillende (an)organische verbindingen in contact gebracht met een misschien wel even grote verscheidenheid aan micro-organismen. De in het influent aanwezige verbindingen worden door de micro-organismen benut voor energielevering en de vorming van celbestanddelen.

Een bepaalde verbinding kan echter niet zomaar door ieder micro-organisme gebruikt worden. Wat dit betreft is sprake van grote verschillen. Sommige micro-organismen zijn bijna 'alleseters', andere bacteriën (b.v. nitrificeerders) zijn daarentegen juist erg gespecialiseerd. Deze diversiteit van de bacteriepopulatie maakt het mogelijk dat zoveel verschillende componenten gelijktijdig uit afvalwater worden verwijderd.

Competitie

Voor veel verbindingen uit afvalwater geldt dat deze door verschillende micro-organismen als voedsel gebruikt kunnen worden. Door de lage F/M-verhouding is er altijd gebrek aan voedsel. Deze combinatie leidt tot een sterke competitie tussen de verschillende micro-organismen om de schaarse voedingsstoffen. De winnaars van de competitie domineren de slibpopulatie. Voor een stabiel proces is het dus noodzakelijk dat omstandigheden gecreëerd worden waarbij de gewenste bacteriesoorten het grootste gedeelte van de beschikbare voedingsstoffen kunnen opnemen.

Niet statisch, maar dynamisch

De actief-slibpopulatie is schijnbaar in evenwicht. In werkelijkheid verandert deze populatie echter voortdurend door seizoensinvloeden, veranderingen van de influentsamenstelling e.d.. Aan het totale zuiveringsrendement is dat meestal niet merkbaar, omdat wijzigingen in de slibpopulatie juist 'gestuurd' worden door het zo optimaal mogelijk benutten van de aangeboden voedingsstoffen. De veelal uitstekende zuiveringsprestaties zijn hier het rechtstreeks gevolg van. Het feit dat de populatie niet statisch, maar juist dynamisch is betekent dat de samenstelling via de procesomstandigheden bewust beïnvloed kan worden. De belangrijkste procesomstandigheden zijn: de slibbelasting, de samenstelling van het afvalwater, de zuurstofvoorziening, de configuratie van de installatie, de pH en de temperatuur. In de praktijk is vrijwel altijd sprake van een gecombineerd effect van deze omstandigheden op de populatiesamenstelling.

8.3.1 Slibbelasting en -leeftijd

Micro-organismen vermenigvuldigen zich via deling van de cel; uit één exemplaar ontstaan daarbij twee nieuwe cellen. De minimaal benodigde tijd voor zo'n celdeling kan bij de verschillende micro-organismen variëren van 30 min. tot enkele dagen. Er is dus sprake van grote onderlinge verschillen in groeisnelheid. Daar komt nog bij dat de groeisnelheid van een bepaald soort ook niet constant is, maar

sterk afhankelijk is van de heersende procesomstandigheden. De beschikbare voedingsstoffen, de temperatuur, de pH en de O₂-voorziening hebben allemaal invloed op de groeisnelheid. De groeisnelheid is alleen maximaal onder optimale omstandigheden. Voor de meeste bacteriën in een actief-slibinstallatie geldt dat de feitelijke groeisnelheid vaak beduidend lager is dan de maximaal mogelijke delingstijd.

De slibbelasting (in kg BZV of CZV per kg d.s. per dag) geeft aan hoeveel voedsel er voor de micro-organismen beschikbaar is. Bij een hogere belasting groeit de populatie sneller. Omdat in de installatie een constant slibgehalte gehandhaafd wordt, betekent dit dat de hoeveelheid spuislib toeneemt en de slibleeftijd daalt naarmate de belasting stijgt. De slibbelasting en de daaraan gekoppelde slibleeftijd hebben daarom grote invloed op de samenstelling van de slibpopulatie. In het slib kunnen zich alleen micro-organismen handhaven met een delingstijd $\leq$ slibleeftijd. Alle andere soorten worden volledig met het spuislib afgevoerd.

Bij hoge belastingen (slibleeftijd: enkele dagen) is er nauwelijks gebrek aan voedsel, waardoor de groeisnelheid van veel soorten maximaal is. De snelste groeiers nemen dan het meeste voedsel op en gaan dus de populatie domineren. Onder deze omstandigheden is de vlok niet erg stevig en zijn vaak veel losse cellen aanwezig. Doordat de vlok uit snelgroeiende soorten bestaat, kan de samenstelling van de slibpopulatie binnen enkele dagen volledig veranderen.

Bij lage slibbelastingen (slibleeftijd: weken) is er relatief weinig voedsel waardoor de micro-organismen langzaam groeien. De bacteriën die het schaarse voedsel efficiënt benutten zijn nu in een gunstige concurrentiepositie. Een belangrijk percentage van de cellen in de vlok is dood of in een soort rusttoestand.

Door de hoge slibleeftijd kunnen micro-organismen die 'bijzondere' verbindingen afbreken, en die vaak langzaam groeien, zich nu ook handhaven. De aanwezigheid van een nitrificerende populatie is hiervan een duidelijk voorbeeld. Een lage belasting gaat dus gepaard met een grotere soortenrijkdom van de populatie.

De vlokken zijn meestal robuust en stevig. De samenstelling verandert niet snel.

8.3.2 Samenstelling van het afvalwater

De herkomst en de voorbehandeling van het afvalwater bepalen de samenstelling van het influent.

Nutriëntenverhouding

Micro-organismen hebben een scala aan voedingsstoffen (= nutriënten) als C, N, P, O en S nodig om optimaal te kunnen groeien. Deze elementen moeten ook nog in een bepaalde onderlinge verhouding aanwezig zijn om volledig voor de groei van de cellen te worden benut. Op koolstof na, moet deze verhouding corresponderen met die in de cel (tabel 4). Van de koolstofverbindingen in het influent wordt circa de helft volledig afgebroken voor energielevering. Deze koolstof ontwijkt als

CO₂. Om deze reden moet het gehalte aan koolstof in de voeding tweemaal zo hoog zijn als nodig is voor celsynthese.

Tabel 4 Globale samenstelling van een bacteriecel.

Element	% van droog gewicht
Koolstof	50
Zuurstof	20
Stikstof	14
Waterstof	8
Fosfor	3
Zwavel	1
Kalium	1
Natrium	1
calcium	0,5
Magnesium	0,5
Chloride	0,5
IJzer	0,2
Overige (Mn, Mo, Zn, etc.)	0,3

In afvalwater is de elementenverhouding praktisch altijd afwijkend van die in tabel 4. Enigszins vereenvoudigd kan gesteld worden dat de groei stagneert zodra één element uit de benodigde reeks (praktisch) op is. De andere elementen blijven dan over. Het element dat het eerst op is wordt vaak de groeibeperkende of limiterende factor genoemd. Groeibeperkende factoren spelen een belangrijke rol bij de vorming van licht slib (zie hoofdstuk 10).

Als in de praktijk sprake is van groeibeperkende omstandigheden, dan betreft dit meestal tekorten aan koolstof, stikstof, fosfor of, als de beluchting ontoereikend is, zuurstof. De overige elementen zijn bijna altijd in voldoende mate aanwezig. Bij de zuivering van stedelijk afvalwater is er een tekort aan koolstofverbindingen. Om deze reden blijft zoveel N en P over en moeten extra zuiveringsstappen in het proces worden opgenomen om deze elementen alsnog te verwijderen. In industrieel afvalwater is vaak een overschot aan koolstofverbindingen. Er moet dan stikstof en/of fosfor gedoseerd worden tot de verhouding BZV: N : P = 100 : 5 : 1. De gewenste dosering kan soms ook gestuurd worden via de analyse van het effluent. Hierin moeten nog 'spoortjes' (0,1 à 0,2 mg/l) van de betreffende elementen in een biologisch opneembare vorm aanwezig zijn.

Koolstofverbindingen

In de meeste installaties vormen de koolstofverbindingen uit het influent de belangrijkste voedsel-/energiebron voor de micro-organismen. De populatiesamenstelling is dan ook sterk afhankelijk van de kwaliteit/aard van de in het afvalwater aanwezige koolstofverbindingen. In industriële installaties groeien dus andere bacteriesoorten dan in communale systemen. Ook binnen de industrie (chemie, zuivel, papier, enz.) is weer sprake van onderlinge verschillen. Dit illustreert de dynamiek van de actief-slibpopulatie: het aanbod van verschillende voedingstoffen leidt tot selectie van andere soorten, waardoor het afvalwater toch wordt gezuiverd.

Overigens kan nog worden opgemerkt dat in industrieel afvalwater verbindingen aanwezig kunnen zijn die alleen door zeer gespecialiseerde micro-organismen afgebroken kunnen worden. Het kweken van zo'n populatie kost soms (veel) tijd.

Deeltjesgrootte

Naast de chemische samenstelling, heeft ook de grootte van de in het influent aanwezige voedseldeeltjes invloed op de populatiesamenstelling. Bij de deeltjesgrootte gaat het vooral om het verschil 'opgelost' en 'niet-opgelost'. Micro-organismen kunnen alleen opgeloste verbindingen direct uit de waterfase opnemen. Niet-opgeloste componenten moeten eerst buiten de cel enzymatisch worden verkleind (hydrolyse). Hierbij worden uit de macromoleculen opgeloste verbindingen als suikers, aminozuren en vetzuren gevormd. Deze worden vervolgens door de cel opgenomen. Micro-organismen die de benodigde enzymen kunnen maken zijn dus in het voordeel bij een groot aanbod van niet-opgelost substraat.

Hydrolyse kost tijd, waardoor de niet-opgeloste componenten uit het influent minder snel opneembaar zijn dan de al opgeloste verbindingen in het afvalwater. Bij het nog te hydrolyseren substraat kan weer onderscheid worden gemaakt tussen langzaam en snel hydrolyseerbaar. Bij voorbezinken wordt een belangrijk gedeelte van de langzaam hydrolyseerbare fractie al in deze tank afgescheiden.

Vers stedelijk afvalwater bevat een grote fractie niet-opgelost substraat. Via hydrolyseprocessen wordt deze fractie kleiner naarmate het afvalwater langer onderweg is voordat het de beluchtingsruimte bereikt. Een lange verblijftijd in het aanvoerriool en/of voorbezinktank leidt dus tot een sterke toename van de opgeloste fractie in het afvalwater. Bij hogere temperaturen verlopen de omzettingen sneller. Zeer globaal heeft ruw communaal afvalwater in Nederland de volgende CZV-samenstelling:

• bezinkbaar	: 30 %
• hydrolyseerbaar	: 35 %
• opgelost/direct biologisch opneembaar	: 30 %
• inerte rest	: 5 %

De fracties 'bezinkbaar' en 'hydrolyseerbaar' omvatten ook celmateriaal van in het influent aanwezige bacteriën.

De grootte van de laagmoleculaire fractie is van belang bij biologische nutriëntenverwijdering, maar speelt ook een rol bij het verschijnsel 'licht slib' (hoofdstuk 10).

Vooral bij de agro-industrie is de grootte van de in het influent aanwezige opgeloste fractie vaak aanmerkelijk groter dan in stedelijk afvalwater.

8.3.3 Zuurstof

De actief-slibmethode is in beginsel een aëroob proces. Aëroob wil zeggen dat moleculaire zuurstof (O_2) beschikbaar is voor de biologische processen. Veel micro-organismen zijn, net als de mens, strikt aëroob. Zonder O_2 stagneren hun stofwisse-

lingsprocessen. Veel soorten kunnen echter wel langere zuurstofloze perioden (uren) overleven, b.v. tijdens het verblijf van actiefslib in een nabezinktank. Er zijn ook micro-organismen die over kunnen schakelen op niet-aërobe stofwisselingsprocessen als moleculaire zuurstof ontbreekt.

Bij een zuurstofgehalte van 2 mg/l in de beluchtingstank zijn alle vlokken met een diameter kleiner dan circa 400 μm tot in het centrum aëroob. Het centrum van grotere vlokken is zuurstofloos. Hierdoor kan in het centrum van zulke vlokken bijvoorbeeld denitrificatie plaatsvinden. Een verlaging van het zuurstofgehalte in het water betekent dat het niet-aërobe gedeelte van de vlokken groter wordt.

Zuurstoftekort leidt tot een afname van de verwerkingssnelheid van het substraat, waardoor dit langer in oplossing blijft. Dit speelt onder andere een rol bij het ontstaan van licht slib.

8.3.4 Configuratie

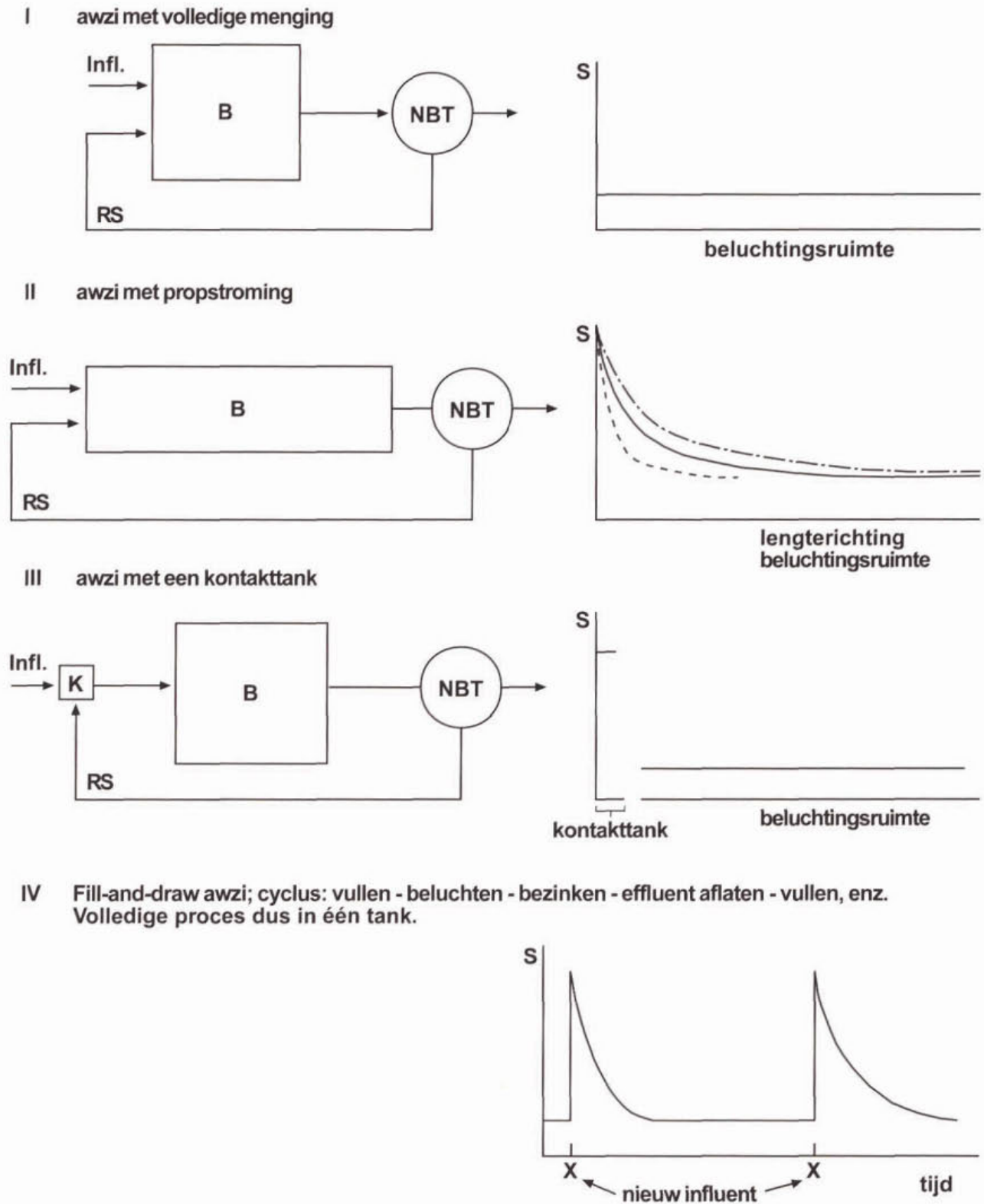
Onder de configuratie van een zuiveringsrichting wordt verstaan: De onderlinge rangschikking en de vorm/inrichting van de diverse onderdelen van de installatie.

Voedselconcentratie

De configuratie is bepalend voor de voedselconcentratie tijdens het mengen van afvalwater en actiefslib en heeft daardoor grote invloed op de samenstelling van de slibpopulatie. De voedselconcentratie in een aantal configuraties is schematisch weergegeven in figuur 71.

In een rioolwaterzuiveringsinrichting (rwzi) met volledige menging (I) wordt het influent verdund met de volledige inhoud van de beluchtingsruimte. De voedselconcentratie in de beluchtingsruimte is daardoor praktisch overal gelijk en laag (idem het gehalte aan BZV of CZV in het effluent). De concentratie wordt hoger naarmate de belasting van de rwzi toeneemt.

In een rwzi met propstroming (II) worden influent en retourslib aan de kopse kant in de beluchtingsruimte gebracht. Het verdunningseffect is daardoor veel kleiner. In het voorste gedeelte van de tank is de voedselconcentratie hoog, deze daalt naarmate het substraat wordt opgenomen door de micro-organismen. Er ontstaat zo een substraatgradiënt in de lengterichting van de tank. Het verloop van de gradiënt is afhankelijk van het voedselniveau tijdens het mengen voorin de tank (de zogenaamde vlokbelading) en de snelheid waarmee de micro-organismen het voedsel opnemen. Wat dit betreft zijn er per rwzi aanmerkelijke verschillen mogelijk. In figuur 71 zijn daarom verschillende gradiënten getekend.



Figuur 71 De invloed van de manier van influent doseren (links) op de substraatconcentratie in de beluchtingsruimte (rechts).

Infl.: influent; RS: retourslib; B: beluchtingstank; NBT: nabezinktank; K: kontakttank of selector; S: voedselconcentratie.

Bij III wordt het influent niet direct in de beluchtingsruimte gebracht, maar eerst in een aparte, zogenaamde kontakttank of selector gemengd met het retourslib. Na een bepaalde verblijftijd in deze tank, wordt het mengsel in de eigenlijke beluchtingsruimte gebracht, waar een sterke verdunning plaatsvindt. Deze procesvoering impliceert een hoge substraatconcentratie in de selector en een laag niveau in de beluchtingsruimte.

Bij een zogenaamde fill-and-draw installatie (IV) wordt een discontinu proces toegepast. Het totale zuiveringsproces wordt in één tank uitgevoerd. Er wordt periodiek een relatief grote hoeveelheid afvalwater toegevoegd. Direct na deze toevoer is de voedselconcentratie hoog. Deze daalt tijdens het beluchten. Na verloop van tijd wordt de beluchting stopgezet. Het slib bezinkt, waarna het bovenstaande water (effluent) kan worden verwijderd. Vervolgens wordt weer afvalwater toegevoegd enz. De oorspronkelijke oxydatiesloot was zo'n sequential batch reactor (SBR).

Configuratie I bevoordeelt micro-organismen die bij een permanent lage voedselconcentratie 'efficiënt groeien'. Bij de systemen II t/m IV is sprake van alternerende omstandigheden: na een korte periode met veel voedsel, volgt een relatief lange tijd waarin geen nieuw voedsel wordt toegevoegd. De volgende selectiecriteria bepalen nu in belangrijke mate de samenstelling van de slibpopulatie:

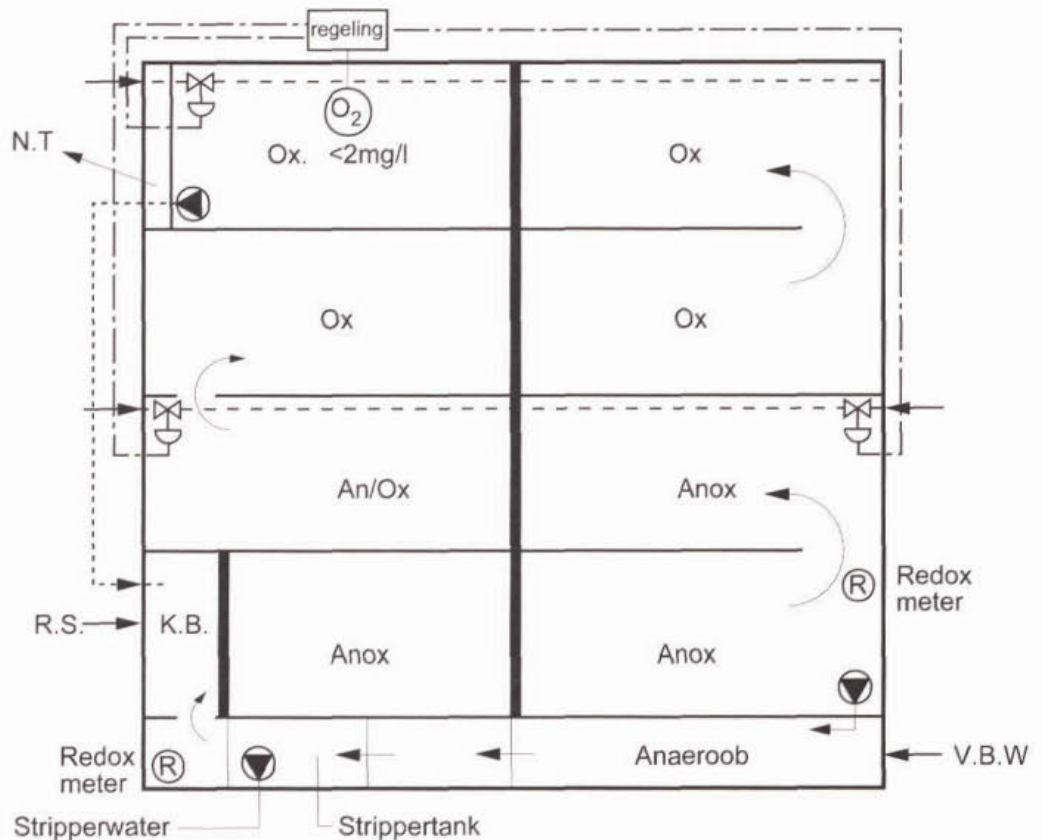
- de (maximale) groeisnelheid tijdens het overschot aan voedingsstoffen;
- het vermogen om snel voedingsstoffen op te nemen en deze als reservestoffen op te slaan (hamsteren);
- het energieverbruik tijdens de lange periode zonder substraattoevoer. Soorten met een hoog energieverbruik 'eten zichzelf op' en gaan dus dood.

Vanzelfsprekend leidt dit tot een andere populatiesamenstelling dan in installaties met volledige menging in de beluchtingsruimte.

Nutriëntenverwijdering

Het via biologische technieken verwijderen van stikstof en fosfor betekent dat een anoxische, respectievelijk anaërobe zone in de proceslijn moet worden opgenomen. In figuur 72 wordt hiervan een voorbeeld gegeven. Anoxisch wil zeggen dat moleculaire zuurstof (O_2) ontbreekt, maar wel nitraat (NO_3^-) beschikbaar is. Onder anoxische omstandigheden wordt het nitraat/nitriet, dat in de aërobe zone via nitrificatie is gevormd, tot stikstofgas gedenitrificeerd. Dit stikstofgas ontwijkt naar de atmosfeer. Als ook het nitraat/nitriet op is, ontstaan anaërobe omstandigheden. De afwisseling van aërobe/anaërobe of van anoxische/anaërobe omstandigheden leidt tot groei van bacteriën die extra fosfaat in hun cellen kunnen opslaan en zodoende verantwoordelijk zijn voor biologische P-verwijdering.

Voor uitvoerige informatie over biologische N- en P-verwijdering wordt verwezen naar andere handboeken (zie hoofdstuk 13). Hier wordt volstaan met op te merken dat beide processen gepaard gaan met verwijdering van vooral gemakkelijk biodegradeerbare koolstofverbindingen uit het afvalwater (de opgeloste fractie). Omdat dit onder anoxische/anaërobe omstandigheden plaatsvindt, is dit voedsel niet (meer) beschikbaar voor strikt aërobe micro-organismen.

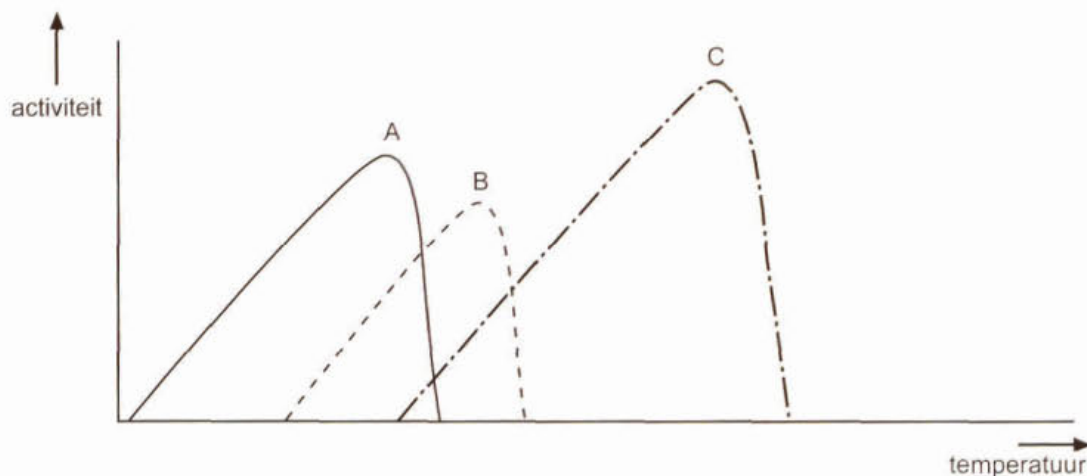


Figuur 72 Voorbeeld van een installatie met biologische N- en P-verwijdering
 V.B.W. = voorbezonden influent; R.S. = retourslib; N.T. = nabesinktank;
 K.B. = kontakttank of selector; Anox = anoxisch, Ox = oxisch of
 aëroob.

8.3.5 Temperatuur en pH

Ieder micro-organisme heeft een specifiek temperatuurtraject waarbinnen het kan groeien (figuur 73). Boven de maximumtemperatuur en beneden de minimumtemperatuur is geen groei mogelijk. Binnen dit traject neemt de activiteit/groeisnelheid toe naarmate de temperatuur stijgt, tot het maximum is bereikt, waarna de activiteit abrupt afneemt bij een verdere toename van de temperatuur. Zoals in figuur 73 is aangegeven, zijn de temperatuurtrajecten van de diverse micro-organismen sterk verschillend. De optimale groeitemperatuur kan variëren van 5-10 °C (arctische gebieden) tot bijna 100 °C (bacteriën die in geisers in vulkanische gebieden leven).

Veranderingen van de watertemperatuur in de installatie leiden daardoor tot verschuivingen binnen de slibpopulatie. Een zeer duidelijk voorbeeld van zo'n verschuiving is het ontstaan van drijfslagen op communale installaties. In Nederland gebeurt dit meestal in de winter. Het is vaak het gevolg van de groei van *Microthrix parvicella*, een draadvormende bacterie die juist bij lage watertemperaturen goed groeit.



Figuur 73 Schematische weergave van het effect van de temperatuur op de activiteit/groeijsnelheid van drie verschillende micro-organismen.

Voor de pH geldt hetzelfde als voor de temperatuur; ook hierbij heeft ieder micro-organisme een specifiek pH-traject met een minimum en een maximum.

Hoewel hierop uitzonderingen bestaan – zo groeien de bacteriën die corrosie van rioolstelsels veroorzaken nog in verdund zwavelzuur met een pH van 1 à 2 – groeien bij een pH > 5 à 6 vooral bacteriën, terwijl schimmels daarentegen lagere pH-waarden prefereren.

8.4 Opname van voedingsstoffen door de vlok

Bij het mengen van afvalwater en actiefslib worden de verschillende componenten uit het afvalwater opgenomen door de vlokken. De grootte/aard van de deeltjes in het afvalwater is bepalend voor de wijze waarop ze door de vlok worden gebonden:

- laagmoleculaire, opgeloste verbindingen kunnen de celwand van de bacteriën direct passeren en worden dus rechtstreeks door de micro-organismen uit de waterfase opgenomen. Opname kost energie, hetgeen betekent dat er niet meer wordt opgenomen dan in de cel kan worden verwerkt. Deze verwerkingssnelheid, die ook de opslag als reservestoffen kan omvatten, is dus bepalend voor de snelheid waarmee de opgeloste fractie uit de waterfase wordt verwijderd.
- hoogmoleculaire, opgeloste verbindingen en colloïdale componenten worden via sorptieprocessen aan de vlok gebonden en vervolgens enzymatisch verkleind (gehydrolyseerd), waarna opname door de bacteriën mogelijk is. De hydrolyseprocessen kunnen snel verlopen. De opname van de gevormde laagmoleculaire verbindingen vormt meestal de snelheidsbepalende stap;
- nog grotere deeltjes worden 'ingevangen' door de vlokken en aansluitend eveneens gehydrolyseerd. Vaak is het oppervlak van deeltjes al tijdens het transport in het riool gekoloniseerd door bacteriën (figuur 74).

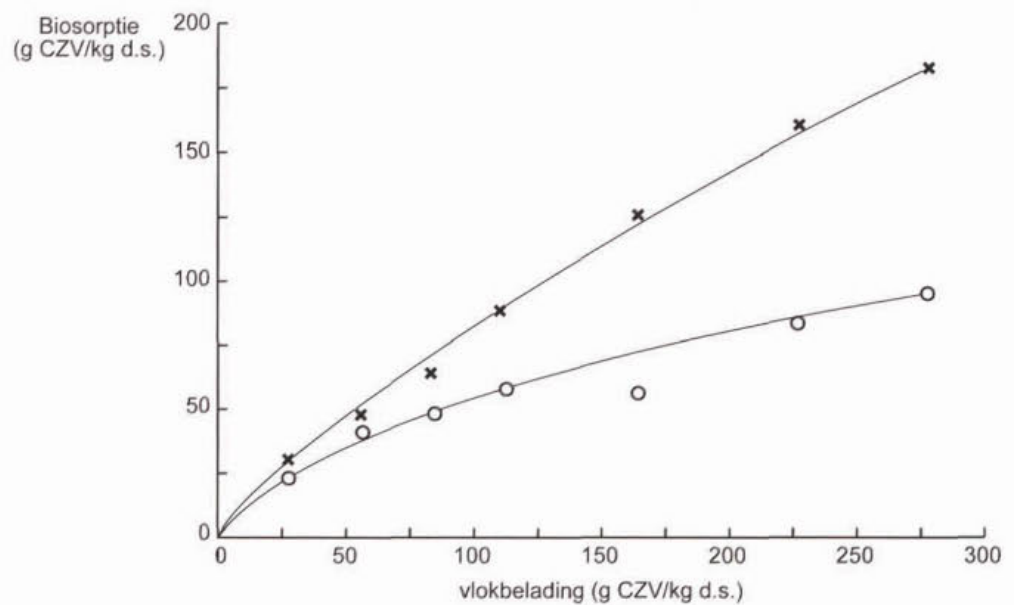
Al deze processen samen worden ook wel aangeduid met de term biosorptie. De grootte/snelheid van de biosorptie is afhankelijk van (1) de samenstelling van het afvalwater, (2) de eigenschappen van het actiefslib en (3) de mengverhouding van

actiefslib en afvalwater. Op de punten (1) en (2) wordt in hoofdstuk 10 nader ingegaan.

De mengverhouding resulteert in een bepaalde vlokbelading (in g BZV of CZV per kg d.s.).



Figuur 74 Het oppervlak van deze vezel is door bacteriecellen gekoloniseerd (5000 x).



Figuur 75 Invloed van de vlokbelading en de contacttijd op de biosorptie door een bepaald actiefslib.

o-o: na 1 min. contacttijd; *x-x:* idem na 10 min.

De vlokbelading¹ is een maat voor de voedselconcentratie die de micro-organismen 'ervaren' tijdens het mengen van afvalwater en slib. De vlokbelading wordt als volgt berekend:

$$\text{vlokbehandeling} = \frac{(CZV_i - CZV_e) Q_i}{X_r \cdot Q_r} \quad (\text{gCZV} / \text{kgd.s})$$

CZV_i	: influent CZV	(g/m ³)
CZV_e	: effluent CZV	(g/m ³)
Q_i	: influent debiet	(m ³ /uur)
Q_r	: retourslibdebiet	(m ³ /uur)
X_r	: droge-stofgehalte in het retourslib	(kg/m ³)

De grootte van de vlokbelading vormt de drijvende kracht voor de biosorptie (figuur 75). Doordat het substraat dieper in de vlok doordringt, wordt er meer voedsel uit de waterfase verwijderd naarmate de vlokbelading hoger is. Het in figuur 75 eveneens aangegeven tijdseffect is het directe gevolg van de biologische activiteit, dat wil zeggen de verwerking van eerder opgenomen substraat.

¹ De vlokbelading is niet hetzelfde als de slibbelasting. Bij de vlokbelading ontbreekt de dimensie tijd. Het is het momentane voedselniveau tijdens het mengen van afvalwater en slib. De slibbelasting (kg BZV of CZV/kg d.s./dag) is een maat voor de hoeveelheid voedsel per dag. Het is een geniddelde waarde, incl. perioden zonder toevoer van afvalwater.

9 Operationele problemen

Het zuiveren van afvalwater is altijd gericht op het produceren van een helder effluent met een zo laag mogelijke restvervuiling. Een vergaande scheiding van slib en effluent in de nabezinktank is daarbij van cruciaal belang. Dit scheiden via bezinken vormt de achillespees van het actief-slibproces. Er is een respectabele lijst van mogelijke oorzaken van een verhoogd zwevend-stofgehalte in het effluent:

1. Veel niet-vlokgebonden cellen. Deze kunnen via bezinken niet worden afgescheiden. Mogelijke oorzaken:
 - een hoge slibbelasting;
 - overbelasting, i.c. chronisch zuurstofgebrek;
 - vergiftiging, i.c. het verdwijnen van de protozoën.
2. Deflocculatie van het slib.

Mogelijke oorzaken:

 - te grote turbulentie in de beluchtingsruimte
 - vergiftiging van het slib;
 - een extreem lage slibbelasting ($\ll 0,05$ kg BZV/kg d.s.-dag);
 - de aanwezigheid van chelerende verbindingen in het influent.
3. De slibvlokken bezinken niet snel genoeg. De slib-volume-index (SVI) is dus te hoog. Dit heet licht slib. Mogelijke oorzaken:
 - draadvormende bacteriën in het slib;
 - een sterke waterbinding door de vlok.
4. Een deel van de slibvlokken bezinkt te snel, waardoor het filtratie-effect van de slibdeken in de nabezinktank verstoord wordt. Dit heet zwaar slib. Mogelijke oorzaken:
 - precipitatie van zouten in de vlokken;
 - aanvoer van zware vlokken met het influent (b.v. doorslaan van de voorbezinktank bij pre-precipitatie).
5. Het slib floteert in de nabezinktank en/of de beluchtingsruimte. Mogelijke oorzaken:
 - de aanwezigheid van bepaalde draadvormende bacteriën;
 - denitrificatie in de nabezinktank;
 - anaërobe condities op de bodem van de nabezinktank;
 - in het slib zijn veel vetten e.d. aanwezig;
 - bouwtechnische oorzaken, waardoor geflooteerd materiaal de installatie niet kan verlaten.
6. Het ontwerp/functioneren van de nabezinktank is niet optimaal. Hierbij kan gedacht worden aan:
 - hydraulische overbelasting

- teveel slib in de nabezinktank (slib-volume-belasting te hoog en/of retour-slibafvoer te laag);
- retourslibdebiet te hoog;
- kortsluitstromingen;
- slibruimer functioneert niet goed;
- ongelijkmatige mesbelasting (tank staat niet waterpas of door windeffecten);
- turbulentie in de nabezinktank, b.v. door temperatuurverschil met de omgeving;
- opwoeling van slib door een ongelijkmatige of onjuist gerichte invoerstroom in de nabezinktank.

Praktisch al deze problemen zijn in beginsel oplosbaar. Voor een efficiënte aanpak van een bepaald probleem is het uiteraard noodzakelijk dat eerst een goede diagnose gesteld wordt. Microscopisch slibonderzoek is hierbij onmisbaar. Wanneer de resultaten van dit onderzoek gecombineerd worden met die van een eenvoudige bezinkproef in een standglas, kan veelal snel worden vastgesteld in welke richting de oplossing moet worden gezocht (figuur 76). Volledigheidshalve is in dit schema ook een stagnerende slibgroei opgenomen.

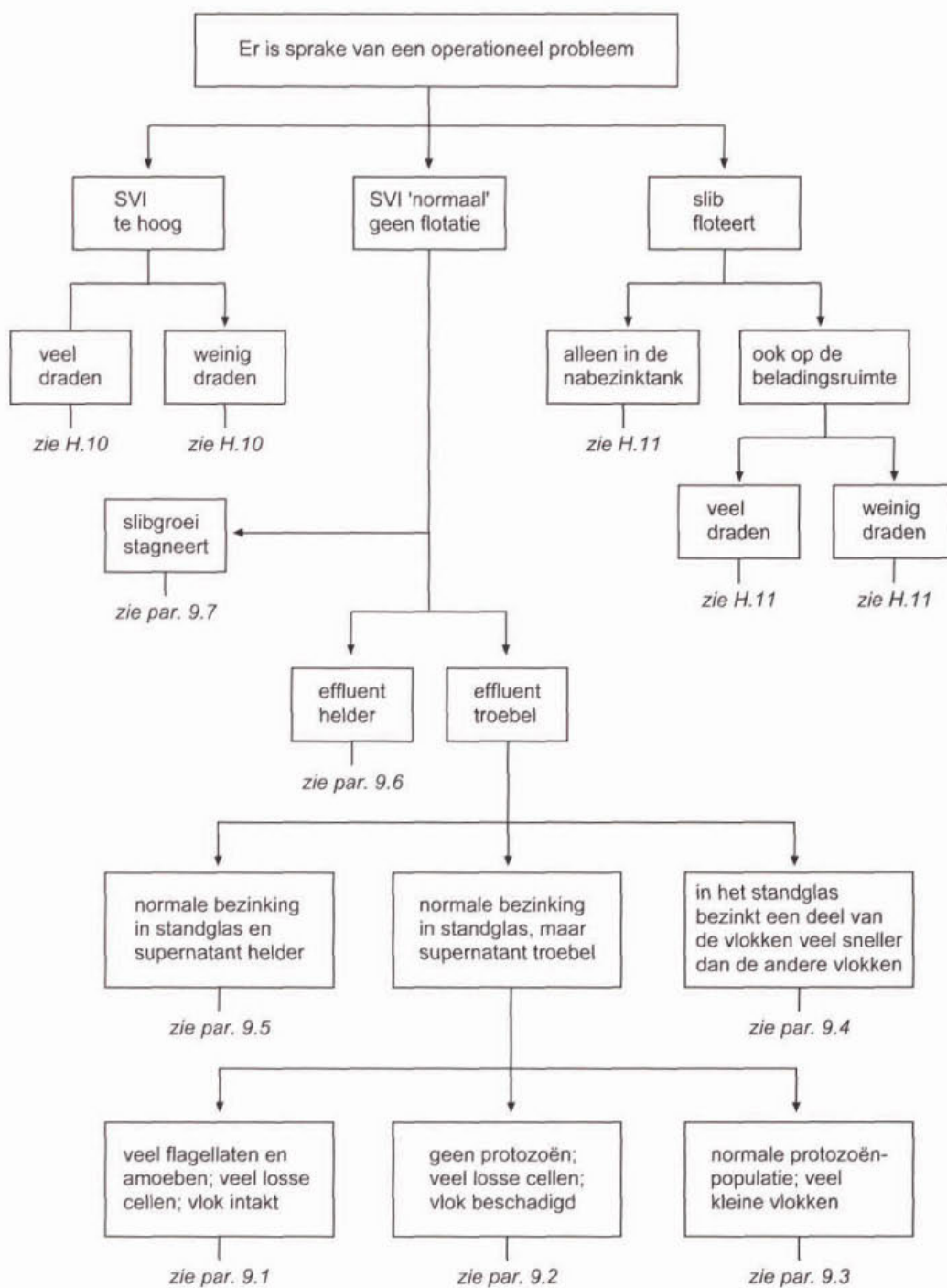
9.1 Hoge slibbelasting en/of zuurstofgebrek

Bij het microscopisch onderzoek is vastgesteld dat tussen de vlokken veel losse bacteriecellen aanwezig zijn. De ciliaten ontbreken, maar er zijn wel veel flagellaten en soms ook amoeben aanwezig. Dit is een karakteristiek beeld van slib uit een hoogbelaste installatie (slibbelasting $> 0,3$ à $0,4$ kg BZV/kg d.s.-dag). Ook overbelasting van een laagbelast systeem leidt (in beperkte mate) tot een toename van het aantal losse cellen en van het aantal flagellaten. Zuurstoftekort – lange anoxische/anaërobe perioden bij nutriëntenverwijdering! – heeft hetzelfde effect. Het met het influent aangevoerde substraat wordt in feite niet snel genoeg opgenomen door de micro-organismen in de vlokken, waardoor groei in de suspensie mogelijk wordt. Het ontbreken van de belangrijkste predatoren (de ciliaten) versterkt dit effect.

De volgende acties moeten worden uitgevoerd om de oorzaak definitief vast te stellen:

- controle van de actuele slibbelasting;
- controle van de zuurstofvoorziening;
- controle van de respiratiesnelheid. Een te hoog niveau duidt ook op een hoge belasting en/of gebrek aan zuurstof.

Bij sommige installaties is de (te) hoge slibbelasting inherent aan het ontwerp van de rwzi. In dat geval kan de effluentkwaliteit alleen via het vergroten van de installatie (of door het verlagen van de CZV-vracht in het influent) verbeterd worden.



Figuur 76 Troubleshooting schema.

9.2 Vergiftiging van het slib

De aanvoer van toxische verbindingen met het influent zal, afhankelijk van de aard en de concentratie van de betreffende componenten, de kwaliteit van het actiefslib als volgt kunnen beïnvloeden:

- de protozoën verdwijnen abrupt. Deze micro-organismen zijn vrij in de waterfase aanwezig en krijgen dus 'de volle laag';
- de buitenkant van de vlok wordt beschadigd, waardoor het aantal losse cellen toeneemt. Het ontbreken van de ciliaten e.d. versterkt dit effect;
- in extreme gevallen gaan grote groepen bacteriën in de vlok dood, hetgeen b.v. tot verlies van de nitrificatie en tot deflocculatie zal leiden.

Dit laatste zal overigens niet zo snel gebeuren, omdat de bacteriën in de vlokken redelijk beschermd zijn tegen blootstelling aan toxische verbindingen. Veel giftige componenten worden bovendien snel onschadelijk gemaakt via sorptie aan de organische slibmatrix.

Een vergiftiging kan binnen enkele dagen worden gevolgd door een explosieve toename van het aantal ciliaten, omdat er tijdelijk veel voedsel (losse bacteriecellen) beschikbaar is. Overigens betekent de terugkeer van de ciliaten tevens dat het toxische effect grotendeels is verdwenen. De effluentkwaliteit zal normaliter binnen enkele dagen weer normaal zijn.

De kans op een vergiftiging kan via de volgende maatregelen worden verkleind:

- het opsporen en saneren van potentiële bronnen;
- buffering van het influent om piekbelastingen met verdachte componenten te voorkomen;
- influentcontrole met behulp van een toxiciteitsmeter. Er zijn dan ook additionele maatregelen nodig om afvalwaterstromen met toxische componenten onschadelijk te maken.

9.3 Veel kleine vlokken; deflocculatie

De aanwezigheid van veel kleine vlokken, terwijl niets wijst op een vergiftiging, kan verschillende oorzaken hebben:

- mechanische beschadiging door het toepassen van oppervlaktebeluchters. Vooral bij hoge slibbelastingen (vlok niet stevig) en in veel industriële installaties (idem) is de sterke turbulentie, die door oppervlaktebeluchters veroorzaakt wordt, de belangrijkste oorzaak van de grote fractie kleine vlokken in het slib;
- deflocculatie door de aanvoer van chelerende verbindingen zoals EDTA. Dit soort verbindingen onttrekt tweewaardige ionen (Ca^{2+} e.a.) aan de vlok waardoor deze desintegreert;
- bij zeer lage slibbelastingen ($\ll 0,05$ kg BZV/kg d.s.-dag) wordt de slijmmatrix om de cellen, die bijdraagt tot de onderlinge binding van de cellen, ten dele afgebroken;
- het doseren van aluminiumzouten (fosfaat-verwijdering; licht-slibbestrijding) leidt tot een forse afname van de gemiddelde vlogrootte. De oorzaak is (nog) niet bekend.

Er kan (nog) niet worden aangegeven via welke procesingrepen de stevigheid van de vlok in hoogbelaste en/of industriële installaties verbeterd kan worden. Dreigende, grote slibverliezen door deflocculatie kunnen daarom alleen via het doseren van vlokkingshulpmiddelen worden voorkomen. Nabehandeling van het effluent (zand- of membraanfiltratie) vormt hiervoor mogelijk een alternatief. Als sprake is van één van de andere oorzaken, kan het probleem via het wegnemen van de oorzaak worden opgelost.

9.4 Zwaar slib

De naam 'zwaar slib' is enigszins misleidend, omdat slechts een deel van de vlokken snel bezinkt. Dat is ook de oorzaak van het probleem. De zware vlokken bezinken zo snel (binnen enkele minuten) dat de opbouw van de slibdeken wordt verstoord. Het filtratie-effect van de slibdeken ontbreekt, hetgeen tot een troebel effluent leidt.

Zwaar slib komt niet vaak voor. Het wordt soms veroorzaakt door de aanvoer van snel-bezinkende vlokken van elders. Hierbij kan gedacht worden aan:

- een voorgeschakeld oxydatiebed;
- aanvoer met het afvalwater;
- doorslaan van de voorbezinktank bij voorprecipitatie.

Ook het massaal uitkristalliseren van zouten in de (grotere) vlokken kan tot het ontstaan van zwaar slib leiden.

9.5 De nabezinktank functioneert niet optimaal

Bij de combinatie van (1) een troebel effluent en (2) een goede bezinking met een helder supernatant in een standglas, moet de oorzaak van het te hoge zwevend-stofgehalte in het effluent in het functioneren van de nabezinktank gezocht worden. Het probleem wordt dus niet veroorzaakt door de biologie. Zoals in de inleiding van dit hoofdstuk is vermeld, moeten nu de volgende punten gecontroleerd worden:

- de actuele en de volgens het ontwerp maximaal toelaatbare hydraulische belasting van de nabezinktank;
- de droge-stofbelasting van de nabezinktank en de hoogte van de slibspiegel;
- het actuele retourslibdebiet;
- bij tanks met een dubbele overstortrand: een eventueel 'schoorsteeneffect';
- eventuele kortsluitstromingen in de nabezinktank (tracer onderzoek);
- het functioneren van de slibruimer;
- het waterpas zijn van de overstortrand. Ook opstuwing van het water door wind kan een ongelijkmatige mesbelasting veroorzaken;
- temperatuurverschillen met de omgeving, die mogelijk tot turbulentie in de nabezinktank leiden;
- de situering van de invoerstroom in de nabezinktank.

9.6 Zuiveringsprestaties niet toereikend; effluent echter helder

Soms komt het voor dat het effluent kraakhelder is, terwijl de zuiveringsresultaten (verwijdering van CZV, N of P) toch niet voldoende zijn. Microscopisch onderzoek heeft uitgewezen dat er geen sprake is van eventuele toxische effecten. Bij deze combinatie is er vrijwel zeker iets niet in orde met de keuze/instelling van belangrijke procesparameters (slibleeftijd, lengte anoxische periode, etc.).

9.7 Afname van de slibproductie

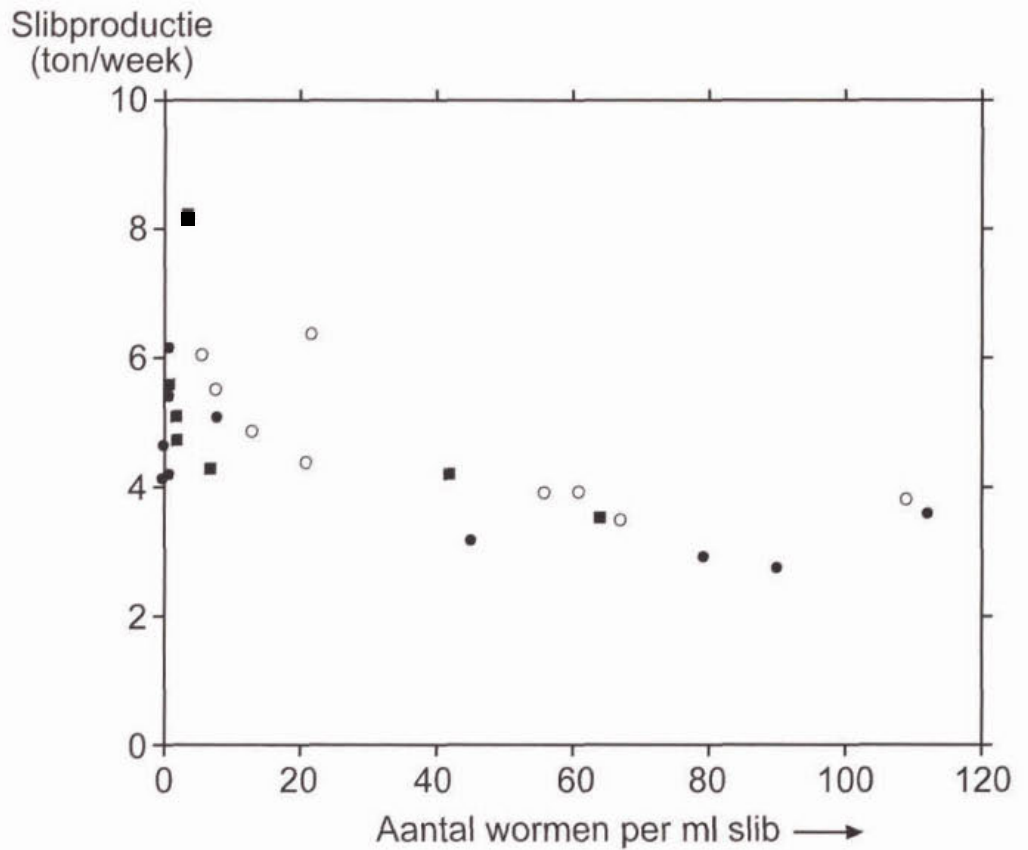
Als bij een gelijk gebleven slibbelasting de slibproductie stagneert, is meestal sprake van één van de volgende twee oorzaken:

- bezinken van slib 'ergens' in de installatie, b.v. door zwaar slib (zie par. 9.4);
- groei van wormen in de installatie.

Wormen zijn de grootste (micro-)organismen die in actiefslib kunnen worden waargenomen. Ze hebben een diameter van circa 0,1 mm en een lengte van maximaal 1-2 cm. Het betreft vrijwel altijd borstelwormen: vaak *Nais elingius*, maar soms ook *Aelosoma* soorten. Wormen zijn in staat om slibvlokken of delen van vlokken op te eten. Bij deze consumptie wordt een deel van het geconsumeerde organisch materiaal omgezet in energie. Een bloei van wormen (orde van grootte: 10^5 wormen/l) gaat dan ook gepaard met een vermindering van de slibproductie (figuur 77).

Overigens kan een massale groei van dit soort organismen tot een verandering van de eigenschappen van het slib leiden, zowel positief (betere bezinkeigenschappen) als negatief (verlies nitrificatie).

De groei van wormen in actiefslib is door nogal wat vraagtekens omgeven. Ze groeien niet extreem traag; onder optimale omstandigheden hebben ze een generatietijd van enkele dagen. Er lijkt, in de vorm van slibvlokken, ook meer dan voldoende voedsel aanwezig te zijn. Onder droog-weer-condities is hun aantal in de retour-slibstroom tweemaal zo hoog als in het slib in de beluchtingsruimte. Onder deze omstandigheden is dus geen sprake van een massale uitspoeling van wormen; het is niet bekend of dit bij hoge hydraulische belastingen wel optreedt. Men zou dus in bijna alle installaties veel wormen verwachten. Desondanks komen wormen in laagbelaste communale installaties niet vaak massaal voor. Slibben met veel wormen zijn meestal afkomstig uit installaties met een slibbelasting van 0,1 kg BZV/kg d.s.-dag en een voorbezonden influent. In installaties met een industrieel influent (sommige agro-industrieën) worden ze echter ook bij lagere slibbelastingen frequent massaal waargenomen. Dit duidt erop dat de eigenschappen van het slib (b.v. energie-inhoud of de aard van de anorganische fractie) mogelijk een belangrijke rol spelen. Ook in deze installaties is het verband tussen hun 'komen en gaan' en de actuele procesomstandigheden echter vaak niet duidelijk.



*Figuur 77 Het verband tussen de slibproductie en het aantal wormen in een bepaalde installatie.**

Wormen kunnen slecht tegen langdurige zuurstofloze perioden. Dit is dan ook een bestrijdingsoptie.

Tenslotte kan worden opgemerkt dat de aanwezigheid van een 'schuilgelegenheid', b.v. de toepassing van bepaalde dragermaterialen in de beluchtingsruimte, de kans vergroot op het handhaven van een grote wormenpopulatie in de installatie.

* C. Ratzak. Grazer induced sludge reduction in waste treatment. Thesis, VU Amsterdam, 1994.

10 Licht slib

Actief-slibvlokken bestaan uit een gemengde populatie van micro-organismen. De populatiesamenstelling wordt bepaald door de kwaliteit van het afvalwater en de procesomstandigheden in de rwzi en is daarom in beginsel beïnvloedbaar. In de meeste rwzi's is, vanuit de micro-organismen gezien, sprake van een chronisch tekort aan voedingsstoffen. Dit leidt tot een sterke competitie tussen de micro-organismen. De soorten die het grootste gedeelte van het schaarse voedsel opnemen, zullen binnen de populatie domineren. Als dit draadvormende micro-organismen zijn, ontstaat licht slib. De aanwezigheid van speciale componenten in het influent, met name gereduceerde zwavelverbindingen (o.a. H_2S), kan daarnaast de groei van bepaalde draadvormers extra stimuleren.

Draadvormende micro-organismen behoren tot de normale slibpopulatie. Er zijn ruim 30 verschillende soorten bekend, voornamelijk bacteriën. De meeste soorten hebben nog geen naam, maar een nummer, omdat hun eigenschappen nog niet voldoende bekend zijn. Van deze 30 soorten veroorzaakt een tiental frequent operationele problemen, de andere soorten worden veel minder vaak in actiefslib waargenomen. Voor meer gedetailleerde informatie over draadvormende micro-organismen wordt verwezen naar hoofdstuk 5.

Zolang het aantal draden beperkt is, heeft hun aanwezigheid geen meetbare invloed op het functioneren van de rwzi. Groei van de populatie leidt echter meestal tot een stijging van het bezinkvolume, waardoor de slibvolume-index (SVI) verslechtert. Omdat de vlokken langzamer bezinken, wordt dit verschijnsel 'licht slib' genoemd. Er is sprake van licht slib zodra de SVI het niveau van 150 ml/g overschrijdt.

Er is ook een vorm van licht slib bekend waarbij draadvormende organismen geen rol spelen. Dit heet Zoogloea licht slib (zie paragraaf 10.5).

Licht slib kan forse zuiveringstechnische problemen opleveren en is kostenverhogend. De problemen betreffen vooral de grote kans op slibverliezen uit de nabezinktank en de slechtere ontwaterings- en indikeigenschappen van het slib.

In het verleden kwam licht slib zeer frequent voor; in 50 à 60 % van alle rwzi's was periodiek of continu sprake van licht slib met SVI-waarden van 400-600 ml/g en soms nog (veel) hoger. De laatste 30 jaar is de kennis over het voorkomen en bestrijden van licht slib echter sterk toegenomen. Vooral in communale installaties is de processtabiliteit daardoor sterk verbeterd. Licht slib komt hierin nog wel voor, met name in de winterperiode, maar de SVI blijft meestal onder het niveau van 250 à 300 ml/g. In veel industriële rwzi's daarentegen, veroorzaakt licht slib nog steeds grote operationele problemen, met name bij branches met veel gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen in het afvalwater (agro-industrie).

10.1 Filament-index en Slibvolume-index

Als microscopisch slibonderzoek ontbreekt in het controleprogramma van een rwzi, wordt de toename van het aantal draden pas gesignaleerd als de bezinkeigenschappen van het slib significant beginnen te verslechteren. Het bezinkvolume neemt eerst nog geleidelijk toe, maar vervolgens zeer snel, omdat sprake is van een logarithmische ontwikkeling. Dit is de reden waarom procesbeheerders, die volstaan met het meten van de SVI, vaak 'overvallen' worden door het ontstaan van licht slib. Via routinematig microscopisch onderzoek kan de groei van draden (= de toename van de filament-index) eerder gesignaleerd worden, waardoor tijdig maatregelen getroffen kunnen worden.

Draadvormende micro-organismen kunnen de bezinkeigenschappen van het slib, inclusief de compressie van de vlokken onderin de nabezinktank, op drie manieren beïnvloeden:

- draadvormende organismen die uit de vlokken steken, of voornamelijk in de vloeistoffase tussen de vlokken aanwezig zijn, verhinderen dat de vlokken elkaar dicht naderen. Het effect is groter naarmate de draden rechter, steviger of langer zijn. De structuur van de vlok wordt hierbij dus niet beïnvloed. Enkele voorbeelden: *S. natans*, *Thiothrix*, Type 021N en Type 0803/0914;
- sommige draadvormers veroorzaken daarnaast een open structuur van de vlok (agglomeraten). Deze wordt groter, maar minder compact. Dit kan veroorzaakt worden door de hechting van vlokvormende bacteriën op de draden. De vlokvormers groeien vervolgens lokaal verder, hetgeen resulteert in vlokjes die door draden met elkaar zijn verbonden. Sommige draadvormende bacteriën vormen ook kluwens van draden, waaromheen vervolgens een vlok ontstaat met een open structuur. Voorbeelden van draadvormers die vaak tot het ontstaan van agglomeraten leiden: Actinomyceten, *M. parvicella*, *N. limicola* III, Type 0092 en Type 1701;
- draadvormende micro-organismen die flotatie van slib veroorzaken, waardoor een drijfslag ontstaat. Hiervoor wordt verwezen naar hoofdstuk 11.

De vorm en de lengte van de draden zijn, naast de grootte van de populatie, doorslaggevend bij hun effect op de bezinkeigenschappen van het actiefslib (tabel 5).

Tabel 5 Invloed van draadvormende organismen op de SVI in communale rwzi's.

Groot	Matig	Gering
<i>M. parvicella</i>	Actinomyceten	<i>N. Limicola</i>
<i>S. natans</i>	<i>H. hydrossis</i>	Type 1863
<i>Thiothrix</i>	Type 0041 ¹⁾	
Type 021 N	Type 0092 ¹⁾	
Type 1851	Type 0803/0914	
	Type 1701	

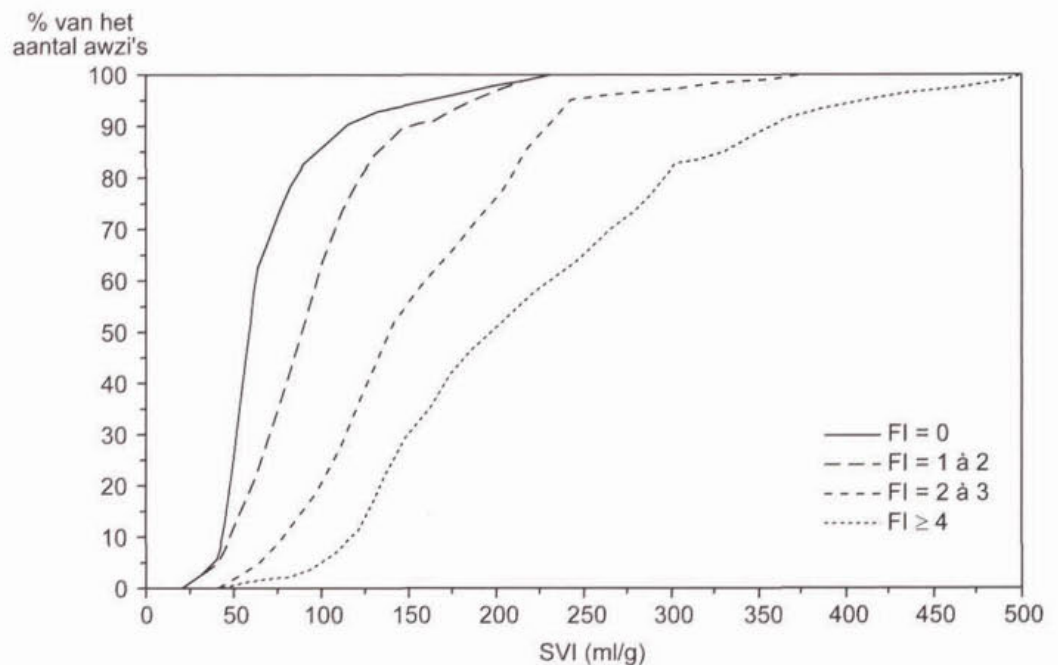
¹⁾ In industriële rwzi's is het negatieve effect vaak groter.

Enkele organismen veroorzaken vrijwel nooit licht slib, omdat ze kleine flexibele draadjes vormen (Type 1863) of zelf als vlokken groeien (*N. limicola*).

Het aantal en het soort draden zijn belangrijke, maar niet de enige factoren die de bezinksnelheid van de vlokken bepalen. De fysisch-chemische eigenschappen spelen ook een rol. Dit betreft:

- de vorm van de vlok. Een 'ronde' vlok bezinkt beter dan een vlok met een onregelmatige vorm;
- de grootte van de vlok;
- de structuur van de vlok. Compacte vlokken bezinken sneller dan open agglomeraten;
- de grootte van de anorganische fractie (de gloei- of asrest). Slibben met een asrest > 40 à 50% bezinken altijd snel, dus ook als veel draden aanwezig zijn;
- de mate waarin water door de vlok wordt gebonden (Zoogloea licht slib);
- de oppervlaktelading van de vlok.

Dit betekent dat het verband tussen de FI en de SVI niet altijd heel duidelijk is, met name als de resultaten van veel verschillende rwzi's worden samengevoegd. In figuur 78 wordt hiervan een voorbeeld gegeven.



Figuur 78 Het verband tussen de FI en de SVI bij een studie van de bezinkeigenschappen van actiefslib in circa 100 oxydatiesloten.

10.2 Groei van draadvormende micro-organismen

Zoals in hoofdstuk 8 is aangegeven, zijn de groeisnelheden van de micro-organismen in actiefslib onderling verschillend en bovendien niet constant, maar afhankelijk van de procesomstandigheden. Een micro-organisme groeit alleen met maximale snelheid als alle benodigde voedingsstoffen in overmaat aanwezig zijn en ook de pH en de temperatuur optimaal zijn. Zodra sprake is van groeibeperkende omstandigheden, dat wil zeggen: tekorten aan 'iets', neemt de groeisnelheid af. Enigszins generaliserend kan gesteld worden dat bij tekorten de groeisnelheid van vlokvormende bacteriën sneller afneemt dan die van de draadvormers. Bij gebrek aan voedingsstoffen gaan draadvormende bacteriën dus relatief sneller groeien. Zij kunnen dan optimaal profijt trekken van hun specifieke morfologische en fysiologische eigenschappen, hetgeen uiteindelijk tot het ontstaan van licht slib kan leiden.

Gebrek aan koolstofverbindingen, in installaties met 'volledige menging' (zie par. 8.3.4), is een belangrijke oorzaak van licht slib. Dit geldt ook voor tekorten aan zuurstof. Industrieel afvalwater bevat vaak te weinig stikstof en fosfor. Incidenteel kunnen tekorten aan andere elementen een rol spelen.

De effecten zijn cumulatief; draadvormende micro-organismen worden dus meer bevoordeeld naarmate het aantal groeibeperkende elementen groter is.

Daarnaast kunnen enkele verbindingen uit het influent de groei van bepaalde draadvormers extra stimuleren, omdat deze componenten niet door veel andere micro-organismen gebruikt kunnen worden (→ weinig concurrentie). Sulfiden (o.a. H_2S) vormen een bekend voorbeeld. Gereduceerde zwavelverbindingen stimuleren de ontwikkeling van *Thiothrix*, Type 021 N, *Beggiatoa* en Type 0914. Op Type 021 N na, kunnen deze draadvormers dan ook gebruikt worden als indicatororganismen voor de aanvoer van sulfiden.

Praktisch alle tot nu toe onderzochte draadvormende micro-organismen kunnen echter alleen voedingsstoffen opnemen en groeien als O_2 beschikbaar is. Ze zijn dus strikt aëroob. Ze groeien weliswaar nog relatief snel bij lage zuurstofconcentraties, maar hun groei stagneert volledig onder anoxische/anaërobe condities. Veel vlokvormende bacteriën kunnen onder zuurstofloze omstandigheden nog wel groeien. Dit gegeven vormt de basis van enkele licht-slibbestrijdingsstrategieën. Hierop wordt in de volgende paragrafen nader ingegaan.

Microthrix parvicella vormt tot nu toe de enige bekende uitzondering op deze regel. *M. parvicella* kan onder anoxische/anaërobe condities weliswaar niet groeien, maar neemt onder deze omstandigheden wel substraat op uit de waterfase.

Als de condities voor draadvormende micro-organismen gunstig zijn, bepalen de overige procesomstandigheden welke soorten gaan groeien. Bij vrijwel iedere, in de praktijk gangbare combinatie van procescondities (slibleeftijd, influentkwaliteit, temperatuur, etc), kunnen draadvormende bacteriën in beginsel groeien. Alleen bij zeer hoge slibbelastingen verliezen de draadvormers de concurrentieslag definitief. Hun maximale groeisnelheid is ontoereikend om zich bij zeer korte slibleeftijden te kunnen handhaven. Boven slibbelastingen van 1 à 1,5 kg BZV/kg d.s./dag worden daarom vrijwel geen draadvormers waargenomen.

10.3 Procesomstandigheden en populatiesamenstelling

In deze paragraaf zal aan de hand van een aantal voorbeelden worden ingegaan op de invloed van de procesomstandigheden op de populatiesamenstelling. De gepresenteerde informatie betreft voornamelijk communale installaties, met soms een substantiële aanvoer van industrieel afvalwater.

Tabel 6 toont het effect van de slibbelasting. Incidentele waarnemingen (dominant aanwezig in minder dan 5% van de rwzi's) zijn niet in de tabel opgenomen. De verwerkte gegevens zijn afkomstig uit Nederland en betreffen de situatie voor de algemene invoering van nutriëntenverwijdering. De groep rwzi's met een slibbelasting $< 0,1$ kg BZV/kg d.s.-dag omvat overigens wel veel oxydatiesloten en carousels, installaties waarin simultane denitrificatie ook in het verleden al standaard werd toegepast, maar nog niet was geoptimaliseerd. Tabel 6 laat zien dat er twee groepen draadvormers kunnen worden onderscheiden.

10.3.1 Slibbelasting $> 0,2$ kg BZV/kg d.s.-dag en communaal influent

De groep die in communale installaties vooral bij slibbelastingen $\geq$ circa $0,2$ kg BZV/kg d.s.-dag wordt aangetroffen bestaat uit Gram-negatieve bacteriën. In industriële rwzi's zijn deze draadvormers ook bij lage slibbelastingen vaak massaal aanwezig.

De meeste soorten van deze groep zijn intussen uit actiefslib geïsoleerd. Onderzoek met reïncultures heeft uitgewezen dat ze groeien op koolstofverbindingen die de rwzi in opgeloste vorm bereiken (suikers, lagere vetzuren zoals azijnzuur, etc.). Deze laagmoleculaire verbindingen ontstaan bij anaërobe omzettingen in het aanvoerriool en/of de voorbezinktank. Om deze reden vergroot een lange transportroute (oud afvalwater) de kans op het ontstaan van licht slib. Bij anaërobe omzettingen ontstaan tevens sulfiden, die, zoals in de vorige paragraaf al is vermeld, de groei van enkele draadvormers extra stimuleren.

Tabel 5 Effect van de slibbelasting op de populatie van draadvormende bacteriën in Nederlandse communale rwzi's zonder (geoptimaliseerde) nutriëntenverwijdering.

+++ : dominant aanwezig in meer dan 40% van de rwzi's

++ : dominant aanwezig in 15-40% van de rwzi's

+ : dominant aanwezig in 5-15% van de rwzi's

Draadvormende organismen	Slibbelasting (kg BZV/kg d.s.-dag)		
	< 0,1 ¹⁾	0,1 - 0,2 ²⁾	> 0,2 ²⁾
<i>M. parvicella</i>	+++	+++	+
Type 0041	++	+	
Type 0092	++	+	
Type 0803	+	+	
Type 0914		+	
Type 0581	+		
Type 2851	+	+	
Actinomyceten	+		
<i>N. limicola</i>	+	++	+
Type 021 N	++	++	+++
<i>H. hydrossis</i>	+	++	+++
Type 1701			+++
<i>S. natans</i>			+++
<i>Thiothrix</i>		+	++
Type 1863			++
Type 0411			++

¹⁾ voornamelijk installaties met (1) ruw influent, (2) vergaande nitrificatie en (3) simultane denitrificatie (niet geoptimaliseerd)

²⁾ voorbezonden influent en soms deelnitrificatie

Het CZV van industrieel afvalwater bestaat vaak voor een groot gedeelte uit gemakkelijk biodegradeerbare, laagmoleculaire verbindingen. Dit is de reden waarom deze Gram-negatieve soorten frequent en massaal in industriële rwzi's groeien.

10.3.2 Karakteristiek voor lage slibbelastingen

De tweede groep is karakteristiek voor slibbelastingen $\leq$ circa 0,1 kg BZV/kg d.s.-dag. *M. parvicella* is de belangrijkste draadvormer in deze groep. Deze draadvormers worden in de literatuur vaak aangeduid met de term 'low F/M filamentous microorganisms'. De groep omvat veel Gram-positieve soorten; diverse vertegenwoordigers van deze groep spelen dan ook een doorslaggevende rol bij de vorming van drijfslagen (hoofdstuk 11).

Met uitzondering van *M. parvicella* en sommige actinomyceten, is er over de fysiologische eigenschappen - welke koolstofverbindingen gebruiken ze voor hun groei, enz. - van de low FM-micro-organismen nog niet veel met zekerheid bekend.

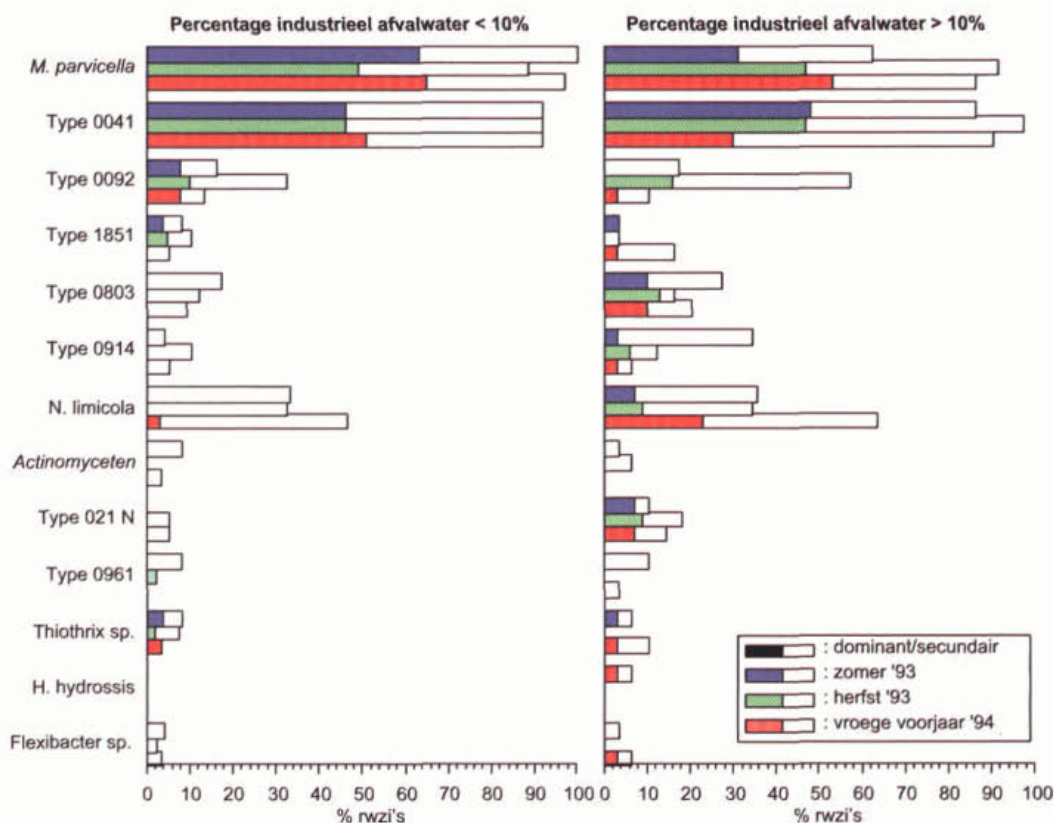
M. parvicella heeft absoluut hogere vetzuren (oliezuur, palmitinezuur, enz.) nodig om te kunnen groeien. In Nederland bestaat 20-30% van het CZV van stedelijk afvalwater uit hogere vetzuren. Het is dus een belangrijke koolstofbron in het influent. Hogere vetzuren bereiken de installatie voornamelijk in de vorm van vetten e.d., hetgeen betekent dat ze in het influent vooral in de niet-opgeloste fractie aanwezig zijn. De vetten moeten eerst gesplitst worden voordat *M. parvicella* de vetzuren kan opnemen. *M. parvicella* heeft, net als andere Gram-positieve soorten, een hydrofoob celoppervlak, waardoor vetten en vetzuren hieraan gemakkelijk sorberen.

Actinomyceten kunnen een breed spectrum aan koolstofverbindingen gebruiken, waaronder ook de vetfractie uit het afvalwater.

Er zijn aanwijzingen dat dit laatste ook geldt voor de Typen 0041, 1851 en 0092.

Type 0803/0914 groeit vrijwel zeker op verbindingen uit de opgeloste fractie in het influent.

M. parvicella is zeer karakteristiek voor huishoudelijk afvalwater; industriële lozingen leiden vrijwel nooit tot een toename van de populatie (figuur 79). Deze figuur toont tevens dat een aantal draadvormers in communale rwzi's vooral groeit op verbindingen die met industrieel afvalwater worden aangevoerd. In industriële rwzi's kunnen deze soorten dan ook massaal aanwezig zijn.

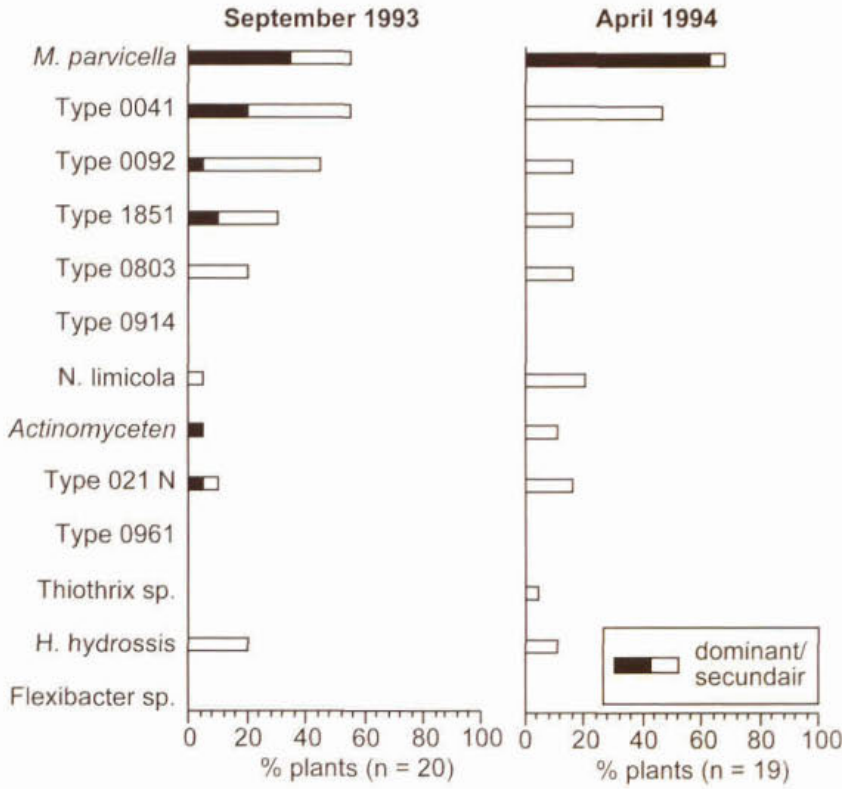


Figuur 79 Effect van industrieel afvalwater op de populatie van draadvormers in Deense, communale installaties.

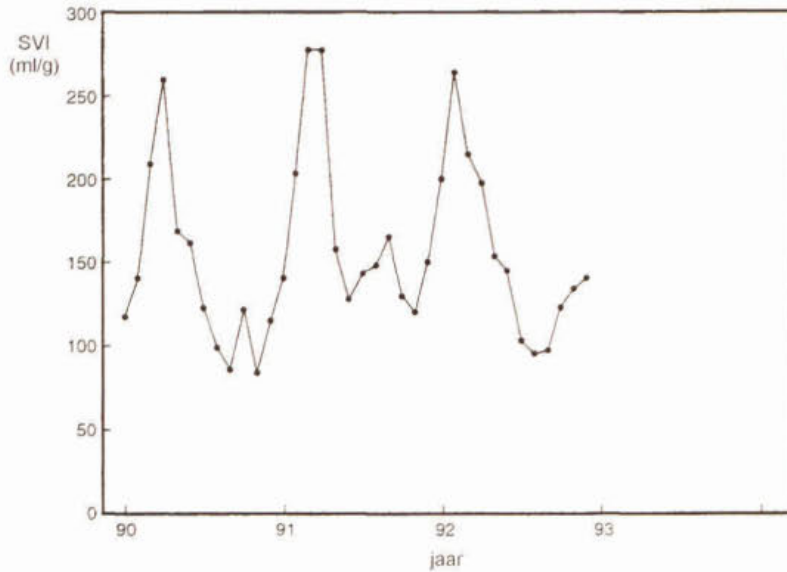
N.B. 1. Alleen installaties met een FI > 2.

2. Voornamelijk laagbelaste installaties met nutriëntenverwijdering.

M. parvicella is een draadvormende bacterie waarvan de populatiegrootte een uitgesproken seizoensritme vertoont. Het aantal draden is maximaal aan het eind van de winter en minimaal in de zomer (figuur 80). Dit leidt tevens tot een zeer karakteristiek patroon van de SVI in veel communale installaties (figuur 81).



Figuur 80 Seizoenseffect op de populatie in Nederlandse rwzi's met nutriëntenuwidering.



Figuur 81 Karakteristiek SVI-patroon in installaties met seizoensgebonden groei van *M. parvicella*.

10.3.3 Effect van biologische nutriëntenverwijdering

Het toepassen van biologische nutriëntenverwijdering betekent dat in de installatie anoxische en/of anaërobe zones gecreëerd worden. In deze zones wordt de opgeloste fractie uit het afvalwater grotendeels verwijderd door denitrificerende en/of Bio-P bacteriën. Draadvormende bacteriën, *M. parvicella* uitgezonderd, kunnen geen substraat opnemen als moleculaire zuurstof ontbreekt. Dit betekent dat de draadvormers die op de opgeloste fractie uit het influent groeien onder deze omstandigheden uitgeschakeld zijn. In figuur 80 ontbreken deze dan ook grotendeels.

Biologische nutriëntenverwijdering stimuleert daarentegen de groei van *M. parvicella*. Zoals tabel 7 illustreert, is dit veruit de belangrijkste draadvormer in installaties met nutriëntenverwijdering. De scores voor Type 0041 in Deense rwzi's zijn weliswaar ook hoog, maar de groei van deze draadvormer leidt in communale installaties vrijwel nooit tot hoge SVI-waarden. Het licht-slibvraagstuk in moderne, communale installaties is in feite dus teruggebracht tot de vraag: Hoe kan de groei van *M. parvicella* beheerst worden. In streken met hogere watertemperaturen dan in West-Europa, spelen daarnaast ook Actinomyceten nog een (belangrijke) rol.

Tabel 7 *Dominerende draadvormende micro-organismen in rwzi's met nutriëntenverwijdering tijdens het vroege voorjaar van 1994.*
Getallen: % van het aantal rwzi's waarin de betreffende draadvormer aanwezig was.

Species	Nederland				Denemarken			Duitsland	Griekenland
	O.S.	Car.	Schr.	V.C. ¹⁾	Bio-P	Bio-Denitro	V.D.	V.C. ²⁾	V.C. ³⁾
<i>M. parvicella</i>	58	66	44	67	74	28	43	75	55
Type 0041	6		11		32	38	20		
Type 0092	3				5	9			10
Type 1851			11			3			
Type 0803					5	3		12	
Type 0914					5				
<i>N. limicola</i>					16	3	10		
Actinomyceten									20
Type 021N		3	11			6			
<i>Thiothrix</i> sp.						6			
<i>S. natans</i>	3		11						
n rwzi's	31	32	9	21	19	32	30	8	11

O.D. = oxydatiesloot

Car. = carroussel

Schr. = Schreiber

V.C. = verschillende configuraties

V.D. = voordennitrificatie

¹⁾ incl. 4 bio-P rwzi's

²⁾ incl. 3 Bio-P rwzi's

³⁾ incl. 2 Bio-P rwzi's

Overigens is het vooraf mengen van influent en slib (contacttijd: enkele minuten), hetgeen in Denemarken praktisch standaard wordt toegepast, de oorzaak van de

opvallend hoge scores voor Type 0041 in Deense rwzi's. De populaties van *M. parvicella* en Type 0041 zijn complementair: als de populatie van de ene draadvormer toeneemt, neemt de ander in aantal af en vice versa.

Er is nog geen sluitend bewijs voor de oorzaak van de sterke groei van *M. parvicella* in rwzi met nutriëntenverwijdering. Er zijn echter sterke aanwijzingen dat de splitsing van vetten onder anoxische/anaërobe condities de concurrentiepositie van *M. parvicella* versterkt. Deze draadvormer kan de vrije hogere vetzuren vervolgens opnemen uit de waterfase; veel vlokvormende bacteriën kunnen deze componenten alleen onder aërobe condities opnemen en verwerken.

10.3.4 Competitie tussen draadvormende organismen

Bij de competitie om de voedingsstoffen beconcurreren de draadvormende bacteriën niet alleen de vlokvormers, maar vaak ook elkaar. Er kunnen daardoor binnen de populatie verschuivingen plaatsvinden, zonder dat het aantal draden afneemt. Men kan dit verschijnsel soms waarnemen in rwzi's met een aantal parallelle en min of meer identieke straten. In deze straten zijn dan wel dezelfde draadvormende micro-organismen aanwezig, maar in wisselende getalsmatige verhoudingen. Er is kennelijk sprake van vrij labiele evenwichten binnen de populatie. Enkele voorbeelden van draadvormers die elkaar soms afwisselen:

- *S. natans* / *Thiothrix* / Type 021 N
- *M. parvicella* / Actinomyceeten / Type 0041 / Type 0092

10.4 Bestrijden van licht slib

Draadvormende micro-organismen kunnen op diverse manieren worden bestreden.

Symptoombestrijding

In de loop der jaren zijn diverse methoden ontwikkeld, waarbij alleen de symptomen worden bestreden en niet de oorzaak wordt weggenomen.

Dit betreft:

- het chemisch vernietigen van de draden, b.v. via het toevoegen van chloor aan het retourslib;
- het mechanisch vernietigen van de draden, b.v. via een ultrasone behandeling van het slib;
- het vergroten van de vlokken via het doseren van flocculanten;
- het verzwaren van de vlokken via het toevoegen van kalk of talk;
- het toevoegen van Fe- of Al-zouten. Het effect van deze producten berust niet louter op vlokverzwaring via precipitatie van hydroxiden en/of fosfaten. Vaak leidt dosering tevens tot een reductie van het aantal draden. Zo is b.v. het toevoegen van Al-zouten vaak effectief voor het bestrijden van *M. parvicella*.

Aan het toepassen van symptoombestrijding kleef een aantal bezwaren zoals neveneffecten op de vlokpopulatie, een grotere slibproductie, de vaak aanzienlijke

kosten en uiteraard het tijdelijk effect. Symptoombestrijding zou daarom alleen moeten worden toegepast bij (1) incidentele licht-slibproblemen, (2) in situaties waarbij plotseling grote slibverliezen dreigen of (3) als er geen structurele oplossingen beschikbaar zijn.

Structurele oplossingen

Structurele oplossingen vereisen een wijziging van de procesomstandigheden zodat de sterke concurrentiepositie van de draadvormende micro-organismen wordt weggenomen. Vaak betreft dit maatregelen waarmee bewerkstelligd wordt dat het grootste gedeelte van de beschikbare koolstofverbindingen daadwerkelijk door vlokvormers wordt opgenomen.

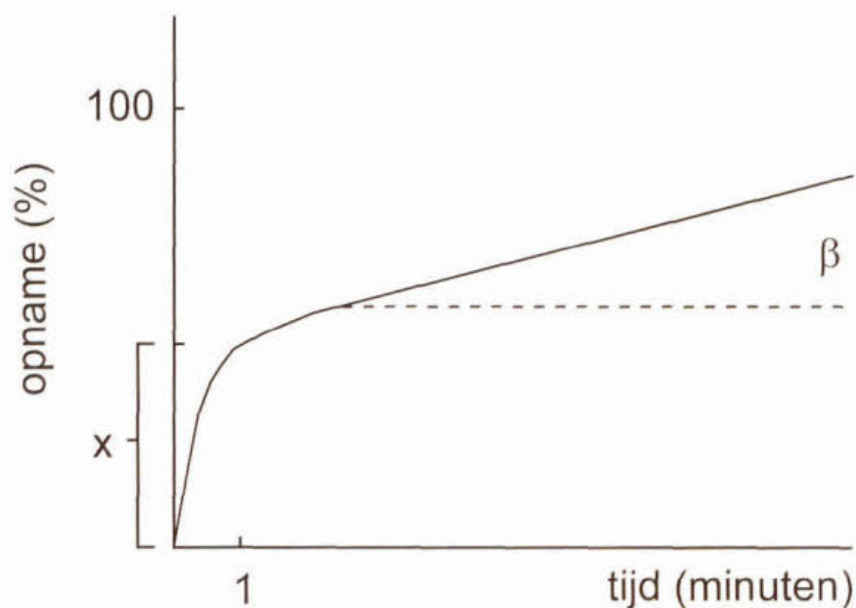
Voor een systematische aanpak kan het volgende stappenplan worden gevolgd:

1. Het opheffen van een eventuele groeibeperking door gebrek aan bepaalde elementen, met name stikstof en/of fosfor (zie par. 8.3.2). Bij communaal afvalwater kan deze stap worden overgeslagen.
2. Controle of de zuurstofvoorziening (nog) wel toereikend is. Het sturen op een zuurstofgehalte $< 2 \text{ mg O}_2/\text{l}$ is een potentieel risico, vooral in volbelaste installaties. Het substraat wordt dan niet snel genoeg verwerkt, waardoor dit langer beschikbaar blijft voor draadvormende bacteriën. Deze worden daarnaast nog extra bevoordeeld, omdat hun groeisnelheid bij lage zuurstofgehalten minder snel afneemt dan die van de vlokvormers.
Ook het creëren van anoxische condities in een deel van de beluchtingsruimte gaat ten koste van de tijd die voor de aërobe verwerking van het substraat beschikbaar is/was.
3. Controle of sulfiden mogelijk de oorzaak vormen. Als bij het microscopisch onderzoek wordt vastgesteld dat veel draadvormende bacteriën aanwezig zijn die sulfiden oxyderen, moet worden nagegaan hoe deze uit het afvalwater kunnen worden verwijderd voordat deze de beluchtingsruimte bereiken. Opties: voorbeluchten, chemische oxydatie, verhinderen dat sulfiden ontstaan, etc.
4. Controle of het influent een grote fractie gemakkelijk biodegradeerbare koolstofverbindingen bevat (b.v. lagere vetzuren). Deze componenten stimuleren de groei van veel draadvormers (zie par. 10.3.1), met name als ook sprake is van tekorten aan N, P of O_2 . Bij industrieel afvalwater is het in een aparte voorbehandelingsstap verwijderen van deze fractie soms een reële optie. Hierbij kan gedacht worden aan een anaërobe voorbehandeling of aan het toepassen van een aërobe hoogbelaste 1^e trap (al dan niet met slibcirculatie). Zoals in par. 10.2 is opgemerkt, groeien draadvormende bacteriën te langzaam om zich bij zeer korte slibleeftijden te kunnen handhaven.
5. Nagaan of een selector, c.q. een selectieve zone toegepast kan worden, om vlokvormende bacteriën selectief te bevoordelen. In de volgende paragrafen wordt deze optie nader toegelicht.

10.4.1 Selectie van vlokvormers door het toepassen van een hoge vlokbelading

De configuratie van de installatie is bepalend voor de voedselconcentratie die de micro-organismen zien tijdens het mengen van influent en slib (par. 8.3.4). Bij volledige menging is de vlokbelading extreem laag en is sprake van groeibepurende omstandigheden door gebrek aan koolstofverbindingen. De vlokbelading is periodiek hoog bij propstroming, in een aparte kontakttank/selector of bij het toepassen van een SBR-procesvoering. Bij deze configuraties is een substraatgradiënt aanwezig (in tijd of plaats), hetgeen de kans op het ontstaan van licht slib aanmerkelijk verkleint.

In figuur 82 is het effect van een hoge vlokbelading op de substraatopname door de vlok schematisch weergegeven.



Figuur 82 Opnamepatroon van substraat bij een hoge vlokbelading.

Binnen één minuut, dus vrijwel momentaan, wordt een gedeelte van het CZV gebonden door de vlok. Dit is een fysisch-chemisch verwijderingsmechanisme (sorptie en invangen), waarbij O_2 geen rol speelt. De grootte van de fractie (= X) die zo verwijderd wordt is afhankelijk van:

- de vlokbelading. Bij een hogere vlokbelading wordt meer substraat gebonden, mede doordat dit dieper in de vlok doordringt. De procentuele verwijdering neemt overigens af, naarmate de vlokbelading stijgt;
- de samenstelling van het afvalwater. Bij de momentane biosorptie worden vooral niet-opgeloste componenten uit het afvalwater door de vlok gebonden. Bij voorbezonken afvalwater is de grootte van X dus substantieel kleiner dan bij ruw influent.

Een korte contacttijd van (ruw) influent en slib is vaak al toereikend om de sterke groei van draadvormers, die op de niet-opgeloste fractie uit het afvalwater groeien, vergaand te reduceren. Dit verwijderingsmechanisme is b.v. verantwoordelijk voor

de opvallende lage score van *M. parvicella* in Bio-Denitro installaties (tabel 7), waar zo'n voormengfase standaard wordt toegepast. Bij een in de praktijk gangbare mengverhouding van influent en retourslib ($r = 0,5$), bedraagt de vlokbelading in de kontakttank 100 à 150 g CZV/kg d.s. Bij een hydraulische verblijftijd van 5 min. komt dit overeen met een slibbelasting van 1,2-1,8 g CZV/kg d.s.·uur. Deze belasting is opgegeven per aanvoerruur, omdat het over de dag middelen van de belasting bij communale installaties tot een onderschatting van het voedselaanbod leidt.

Figuur 82 laat zien dat de momentane biosorptie gevolgd wordt door een geleidelijker opnameproces. Dit betreft opname door micro-organismen van gemakkelijk biodegradeerbare componenten uit het afvalwater (opgeloste en snel hydrolyseerbare verbindingen). De snelheid waarmee dit gebeurt, is afhankelijk van de biologische activiteit. Deze activiteit kan beïnvloed worden. Het toepassen van een hoge vlokbelading leidt namelijk tot de groei/selectie van vlokvormende bacteriën die snel substraat kunnen hamsteren. Circa 75% van het opgenomen substraat wordt in de cel opgeslagen in de vorm van reservestoffen. *M. parvicella* uitgezonderd - deze groeit echter op een andere fractie uit het influent - kunnen draadvormers niet snel veel substraat opslaan in de cellen. Via het introduceren van een hoge vlokbelasting kan dus een slib gekweekt worden waarin vlokvormende bacteriën het gemakkelijk afbreekbare substraat in 10-20 min. grotendeels uit de waterfase verwijderen. In tabel 8 wordt hiervan een voorbeeld gegeven. De kans op licht slib wordt daarmee sterk verkleind. Het kweken van slib met deze eigenschap vergt meestal enkele weken.

Tabel 8 Biosorptie door twee soorten actiefslib. Slib A is afkomstig uit een rwzi met een selector.

	Vlokbelading (mg CZV/g d.s.)	tijd (min.)	biosorptie (mg CZV/g d.s.)	opgenomen (%)
slib A + influent A	123	1	80	65
		10	104	85
		30	107	96
slib A + influent B	50	1	20	39
		10	46	92
		30	47	93
slib B + influent B	37	1	5	13
		10	13	36
		30	13	36
slib B + influent A	91	1	14	15
		10	22	24
		30	33	27

Er is nog een tweede randvoorwaarde waaraan voldaan moet worden om dit verwijderingsmechanisme goed te laten functioneren: na passage van de zone met de hoge vlokbelading moeten de micro-organismen voldoende tijd krijgen om het gehamsterde substraat daadwerkelijk te verwerken. De biosorptiecapaciteit moet volledig geregenereerd zijn als de vlokvormers de selector weer bereiken. Dit regeneratieproces kost tijd. Het is een praktijkgegeven dat in installaties met een slibbelasting > circa 0,4 kg BZV/kg d.s.·dag de voor deze regeneratie benodigde

tijd ontbreekt. Dit kan soms ondervangen worden door een extra beluchtingsstap van het retourslib. Deze kritische grens wordt lager als de zuurstofvoorziening in de beluchtingsruimte niet toereikend is ($< 2 \text{ mg O}_2/\text{l}$). Ook bij lage watertemperaturen ($\rightarrow$ afname van de activiteit van de micro-organismen) is meer tijd voor regeneratie nodig.

De zogenaamde aërobe selector is op het voorafgaande gebaseerd. Deze is de laatste jaren met succes toegepast voor het bestrijden van licht slib in industriële rwzi's met een grote fractie gemakkelijk afbreekbaar substraat in het influent. Met een goed gedimensioneerde propstroominstallatie of met een SBR-systeem kan hetzelfde bereikt worden. Voor het bestrijden van licht slib in communale installaties is een aërobe selector minder geschikt, omdat het voor denitrificatie en/of Bio-P-verwijdering benodigde substraat dan onder aërobe condities wordt vastgelegd (zie ook par. 10.4.3).

10.4.2 Dimensionering van een aërobe selector*

Uitgangspunt vormt dat de gemakkelijk afbreekbare fractie, ook tijdens piekbelastingen, in de selector praktisch volledig uit de waterfase wordt verwijderd. In vergelijking (1) is weergegeven hoe het volume van de selector bepaald kan worden:

$$V_{\text{sel}} = \frac{Q \cdot S_{\text{sel}}}{OS_{\text{sel}} \cdot r_{\text{sub}}} \quad (1)$$

V_{sel} : volume van de selector (m^3)

Q : influentdebiet (m^3/h)

S_{sel} : gehalte aan gemakkelijk afbreekbare verbindingen in het influent ($\text{kg CZV}/\text{m}^3$)

QS_{sel} : vracht aan gemakkelijk afbreekbare verbindingen in het influent ($\text{kg CZV}/\text{h}$)

OS_{sel} : organische-stofgehalte in de selector (kg/m^3)

r_{sub} : specifieke substraatopnamesnelheid bij een toereikende zuurstofvoorziening door slib dat al 'gewend' is aan een hoge vlokbelading ($\text{kg CZV}/\text{kg OS} \cdot \text{h}$)

In beginsel wordt de volledige retourslibstroom door de selector gevoerd. Als dit echter tot een vlokbelading $\ll 100 \text{ g CZV}/\text{kg d.s.}$ leidt, moet met een deel van de

* Prendl, L.: Ein Beitrag zu Verständnis und Anwendung aerober Selektoren für die Blähschlammvermeidung. Weiner Mitt. 139, 1997.

retourslibstroom worden volstaan. Het influent moet altijd volledig via de selector worden geleid.

In industriële rwzi's is de asrest vaak 20-30%, incidenteel kan dit percentage echter veel hoger zijn.

De grootte van de fractie gemakkelijk biodegradeerbare verbindingen in het influent kan geschat worden door van de opgeloste fractie de BZV/CZV-verhouding te bepalen. Bij gemakkelijk afbreekbare verbindingen is de verhouding bijna 1.

De specifieke substraatopnamesnelheid moet in een vooronderzoek experimenteel worden vastgesteld. Als dat niet mogelijk is, kan bij industrieel afvalwater, mits S_{sol} groter is dan 200 mg/l, gerekend worden met $r_{sub} = 0,5$ kg CZV/kg OS.h. Deze snelheid moet proportioneel worden verlaagd als minder dan 200 mg/l aan gemakkelijk afbreekbare verbindingen in het influent aanwezig zijn. Het wordt echter afgeraden om voor r_{sub} waarden $< 0,2$ kg CZV/kg OS.h toe te passen ($\rightarrow$ grote selectoren). Deze dimensioneringsgrondslagen leiden tot selectoren met een totale waterverblijftijd (slib + influent) van 10-30 min.

Voor het vaststellen van de benodigde beluchtingscapaciteit moet bekend zijn welk gedeelte van het substraat al in de selector wordt verademd (de rest wordt omgezet in reservestoffen). Als dit percentage niet bekend is, kan een waarde van 25% worden toegepast. Dit leidt dan tot een beluchtingscapaciteit van $0,25 \cdot Q \cdot S_{sol}$ (kg O_2 /h) in de selector.

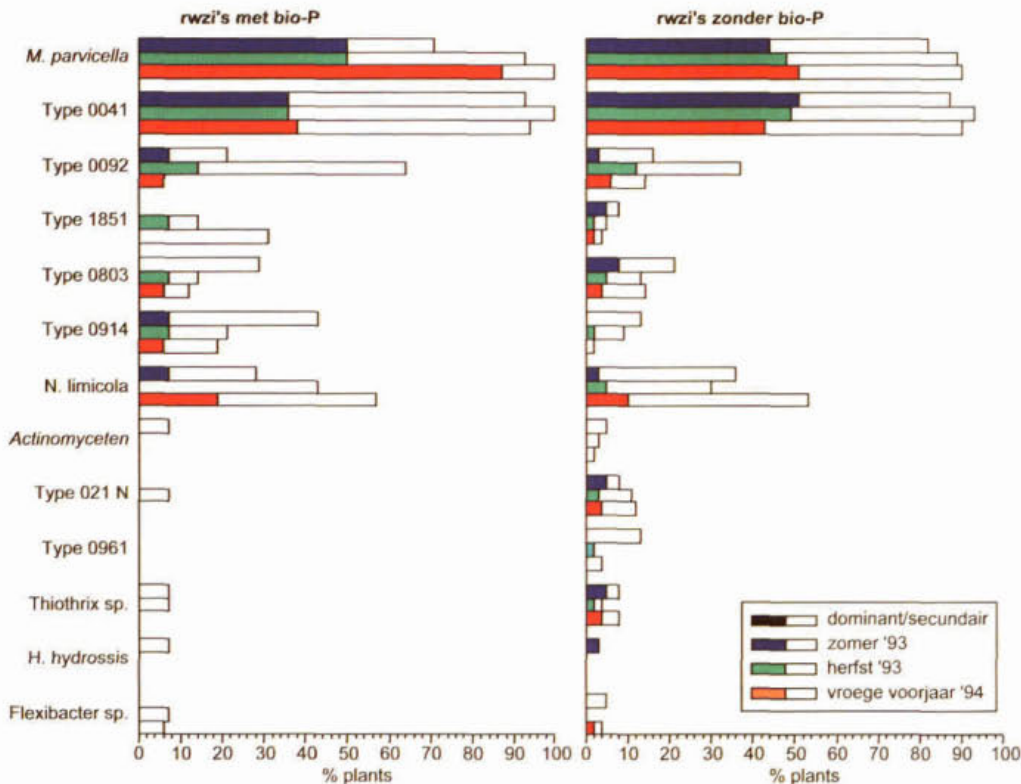
De selector moet gecompartmenteerd worden uitgevoerd, met bij voorkeur minstens vier compartimenten. Een configuratie met propstroming kan uiteraard ook. Dit leidt tot een zeer hoge slibbelasting in de eerste compartimenten, hetgeen de substraatopname door de vlok bevordert.

Bij sterke schommelingen van het CZV van het influent, moet de selector op de piekbelastingen gedimensioneerd worden. Tijdens perioden met een lage aanvoer is de selector dan in feite overgedimensioneerd, hetgeen door de compartimentering geen probleem vormt.

Slib kan maximaal circa 0,4 g substraat per gram organische stof opslaan. Om het selectiemechanisme goed te laten functioneren, mag maximaal 50% van deze opslagcapaciteit worden benut. Dit betekent dat de vlokbelasting (met 'opgelost' substraat) maximaal 200 mg CZV/g OS mag bedragen. Bij zeer geconcentreerd afvalwater kan een aërobe selector dus niet zonder meer worden toegepast.

10.4.3 Combinatie met nutriëntenverwijdering

Installaties voor biologische nutriëntenverwijdering worden primair gedimensioneerd op een vergaande verwijdering van stikstof en/of fosfor. Er wordt een lage slibbelasting toegepast om een volledige nitrificatie te bewerkstelligen. De opgeloste CZV-fractie uit het afvalwater wordt onder anoxische/anaërobe condities door micro-organismen in het slib opgenomen. Bij deze procesomstandigheden, vooral als naast denitrificatie ook Bio-P-verwijdering wordt toegepast, worden eigenlijk alleen nog low F/M draadvormers in actiefslib aangetroffen, met name *M. parvicella* (figuur 83).



Figuur 83 Populatie van draadvormers in Deense installaties met nutriëntenverwijdering en een $FI \geq 2,5$.

Het toepassen van een hoge vlokbelading, dan wel de aanwezigheid van een substraatgradiënt heeft nog wel enig effect op de groei van draadvormers. Zo konden bij een onderzoek in rwzi's met nutriëntenverwijdering, de installaties als volgt naar een afnemende populatiegrootte van de draadvormers worden gerangschikt:

- volledige menging + simultane denitrificatie;
- volledige menging + intermitterende denitrificatie/beluchting;
- alternerend anoxische/oxische condities, met een voorgeschakelde anaërobe tank voor Bio-P (Bio-Denipho);
- alternerend anoxische/oxische condities (Bio-Denitro);
- voordennitrificatie.

Ook bij voordennitrificatie wordt echter nog vaak een grote *M. parvicella* populatie aangetroffen. Een hoge vlokbelading is mogelijk wel gunstig voor de snelheid van de nutriëntenverwijderingsprocessen - het substraat dringt dieper door in de vlok - maar niet toereikend om de groei van *M. parvicella* afdoende te beheersen.

Het staat vast dat het introduceren/optimaliseren van nutriëntenverwijdering de groei van *M. parvicella* stimuleert. Zo werd b.v. bij een onderzoek in 25 Nederlandse rwzi's vastgesteld dat de SVI in 60% van de installaties was gestegen na de wijziging van de procesomstandigheden. In 16 van deze rwzi's ontstond licht slib door de sterke groei van *M. parvicella* tijdens de wintermaanden. Dit gebeurde ook in rwzi's waar in het verleden met succes een selector (veelal niet belucht; korte HRT) was geïnstalleerd voor het bestrijden van deze draadvormers. Ook in andere

landen is het aantal installaties met licht slib door de introductie van nutriëntenverwijdering weer toegenomen.

Een consistente verklaring voor dit verschijnsel ontbreekt vooralsnog. Er wordt daarom volstaan met de opsomming van enkele punten die met de groei van *M. parvicella* verband houden:

- de combinatie van ruw influent + een selector voor de binding van niet-opgelost substraat + oxische condities in de beluchtingsruimte is effectief voor het beheersen van de groei van *M. parvicella*. Met voorbezonken afvalwater zijn de resultaten minder consistent;
- het creëren van anoxische condities in een deel van de beluchtingsruimte leidt vaak, ook als een selector voorgeschakeld is, tot de ontwikkeling van *M. parvicella*. Bij een anoxisch volume > 40-50% in de aëratietank ontstaat praktisch altijd licht slib;
- de combinatie van (1) een selector en (2) alternerend anoxische/oxische condities (Bio-Denitroconfiguratie) verkleint daarentegen de kans op een massale groei van *M. parvicella*. Deze procesvoering stimuleert weliswaar Type 0041, maar dit leidt slechts zelden tot licht slib;
- het voorschakelen van een anaërobe tank (HRT: 1-3 uur; al dan niet gecompartmenteerd) voor Bio-P-verwijdering gaat gepaard met een sterke toename van *M. parvicella*. Door de zware Bio-P-clusters in de vlokken, stijgt de SVI overigens niet overeenkomstig;
- condities waarbij vetten onder anoxische of anaërobe condities gesplitst worden (→ vrije hogere vetzuren) versterken vrijwel zeker de concurrentiepositie van *M. parvicella*. Voor het beheersen van de groei van deze draadvormers, moeten de hogere vetzuren irreversibel door de vlok worden gebonden, voordat *M. parvicella* ze kan opnemen;
- in Nederland wordt op enkele rwzi's een selector toegepast tussen de anaërobe en de anoxische zone (figuur 72). De eerste ervaringen met deze configuratie zijn positief, maar het aantal rwzi's is nog te klein voor het trekken van definitieve conclusies.

Omdat structurele oplossingen nog niet beschikbaar zijn, wordt vaak symptoombestrijding toegepast voor het bestrijden van *M. parvicella*. Het doseren van aluminiumzouten (3 g Al³⁺/kg d.s./dag) is vrijwel altijd effectief. Op deze wijze wordt chemische fosfaatverwijdering gecombineerd met licht-slibbestrijding. Dosering leidt binnen 2-3 weken tot een forse afname van het aantal draden; een eventueel aanwezige drijfslaag is vaak al eerder verdwenen.

10.5 Zoogloea licht slib

Zoogloea licht slib wordt niet veroorzaakt door de groei van draadvormende bacteriën, maar door de sterke binding van water door de vlok. Deze vorm van licht slib komt slechts incidenteel voor. De microscopisch gemakkelijk herkenbare zoogloea kolonies zijn overigens niet altijd aanwezig.

De sterke waterbinding wordt veroorzaakt door een hoog gehalte aan biopolymeren in de vlok.

Biopolymeren worden soms gevormd bij hoge slibbelastingen. Als een hoge slibbelasting de oorzaak vormt, kan alleen symptoombestrijding worden toegepast. Ook een niet uitgebalanceerd voedselaanbod, met name een overschot aan koolstofverbindingen, kan tot de vorming van veel biopolymeren leiden. In dat geval bestaat de remedie uit het doseren van nutriënten.

11 Flotatie van slib

Flotatie van actiefslib leidt tot de vorming van een drijfslaag op de beluchtingsruimte en/of nabezinktank. Het begint vaak met het ontstaan van grote blazen of van donker gekleurd schuim op het oppervlak van de beluchtingsruimte. Het is duidelijk geen detergentenschuim, dat veel witter is. Op plaatsen waar dit materiaal samenklontert ontstaat een drijfslaag. In extreme gevallen kan het oppervlak van de installatie volledig worden bedekt door een tientallen cm's dikke laag geflooteerd slib, met een droge-stofgehalte van 30-50 g/l (figuur 84).

Drijfslaagvorming is naast licht slib het tweede grote stabiliteitsprobleem in actief-slibinstallaties. De invoering van biologische nutriëntenverwijdering heeft tot een forse toename van het aantal rwzi's met een drijfslaag geleid. In Nederland is op circa 50% van alle laagbelaste installaties tijdens de winterperiode een drijfslaag aanwezig.

Drijfslaagvorming leidt tot slibverliezen, een minder goede effluentkwaliteit, stankhinder, esthetische bezwaren, minder veilige werkomstandigheden en extra schoonmaakwerkzaamheden. Afvoer van geflooteerd materiaal naar de slibgisting leidt ook in deze tank vaak tot drijfslaagvorming. Bij bevriezen van de drijfslaag kunnen de wanden van de tanks en de ruimers in de nabezinktank beschadigd worden.

Draadvormende micro-organismen zijn in communale installaties bijna altijd de hoofdoorzaak van het ontstaan van een drijfslaag. Licht slib en drijfslaagvorming zijn dus frequent aan elkaar gekoppeld. Voordat hierop nader wordt ingegaan, zullen in de volgende paragraaf eerst enkele andere mogelijke oorzaken kort worden toegelicht.

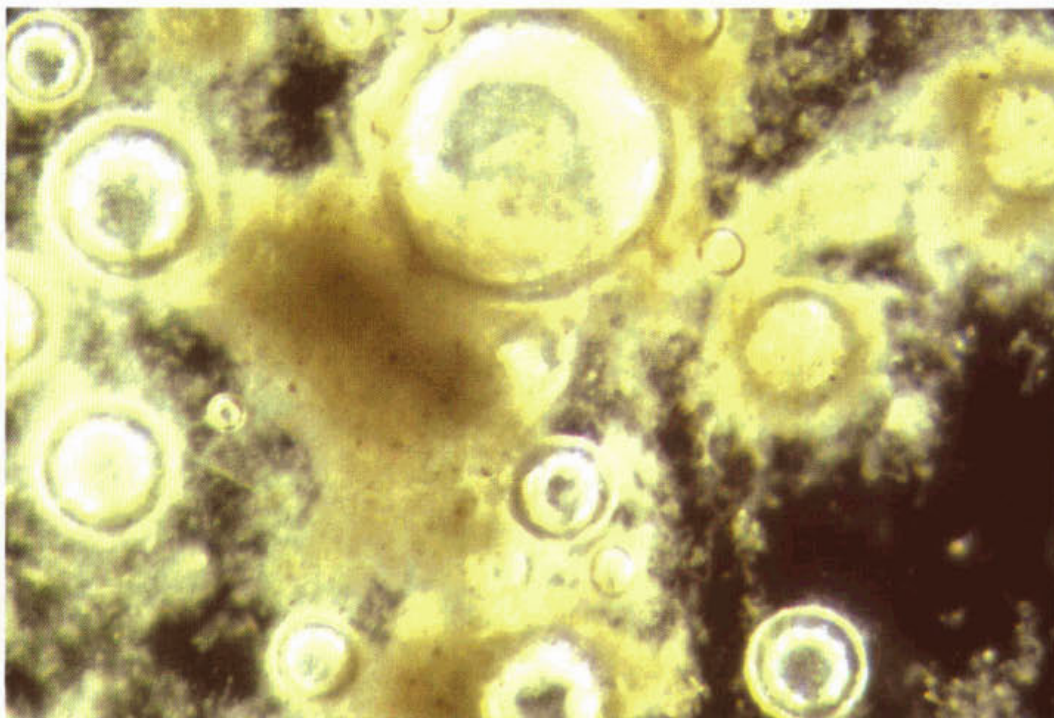
11.1 Drijfslaagvorming waarbij draadvormers geen doorslaggevende rol spelen

Denitrificatie in de nabezinktank

Als het slib alleen in de nabezinktank flooteert, het oppervlak van de beluchtingsruimte is dus praktisch schoon, is meestal sprake van drijfslaagvorming door denitrificatie in de nabezinktank. Denitrificatie leidt tot de vorming van belletjes stikstofgas. Deze zijn opgesloten in de geaggregeerde vlokken onderin de nabezinktank. Het slib flooteert vaak in proppen, die langzaam naar het wateroppervlak stijgen. De stikstofgasbelletjes zijn niet stevig aan de vlokken gebonden. Bij een geringe turbulentie, b.v. door te roeren of door versproeien van effluent op het geflooteerde slib, ontwijken de belletjes. De vlokken bezinken vervolgens weer. Draadvormende bacteriën kunnen het flotatieproces versterken, maar zijn niet de hoofdoorzaak.



Figuur 84 Het wateroppervlak van deze rwzi is volledig door een drijflaag bedekt.



Figuur 85 Gestabiliseerde gasbellen in de drijflaag (50 x).

Dit verschijnsel is meestal het gevolg van de aanwezigheid van nog niet verwerkt substraat in de vlok. Het mineralisatie-proces is dus niet voltooid als het slib de nabezinktank bereikt. Wegens het ontbreken van zuurstof, wordt overgeschakeld op het gebruik van nitraat voor de stofwisselingsprocessen (→ denitrificatie). Het proces wordt versterkt door een hoog nitraatgehalte in het slib en een (te) lange verblijftijd van het slib in de nabezinktank.

Bouwkundige oorzaken

Soms is sprake van de volgende combinatie:

- geen drijfslaag op de nabezinktank;
- wel drijfslaagvorming op de beluchtingsruimte;
- weinig/geen draadvormende micro-organismen in het slib;
- geen verband met industriële lozingen.

In dat geval heeft de drijfslaag meestal een bouwkundige oorzaak.

Op de beluchtingsruimte floteert altijd wel wat. Dit materiaal wordt normaliter gesuspendeerd door de beluchting in de tank of afgevoerd naar de nabezinktank en daar afgevangen.

Bij omloopsystemen zijn de beluchters echter soms overkapt. Als deze overkapping tot onder het water reikt, blijft alles wat floteert voor de overkapping hangen. Er ontstaat bijna vanzelf een drijfslaag.

Ook als in omloopsystemen de overloop naar de nabezinktank achter de puntbeluchters is geplaatst, ontstaat gemakkelijk een drijfslaag. Het stromingspatroon rond de puntbeluchter leidt tot retentie van gefloeteerd materiaal in de zone vlak voor de beluchter. Gefloeteerd materiaal is dus eigenlijk opgesloten in de aëratietank. Een duikschot in de overloop naar de bezinktank heeft hetzelfde effect.

Doordat draadvormende micro-organismen ontbreken, zijn dit soort drijfslagen niet gestabiliseerd. Ze kunnen via het versproeien van effluent gemakkelijk worden vernietigd.

Industriële lozingen

Beheerders van communale installaties houden de lokale industrie vaak verantwoordelijk voor het ontstaan van drijfslagen. Lozingen van vetten of van detergenten kunnen inderdaad tot het ontstaan van een drijfslaag leiden. In communale rwzi's wordt drijfslaagvorming echter bijna altijd primair veroorzaakt door micro-organismen die op componenten uit huishoudelijk afvalwater groeien.

11.2 Gestabiliseerde gasbelletjes

Persistente drijfslagen ontstaan door hechting van kleine, maar uitermate gestabiliseerde gasbelletjes aan de vlokken (figuur 85). Er is slechts een geringe hoeveelheid gas nodig om de dichtheid van actiefslib zover te verlagen dat het blijft drijven: 0,44 cm³ lucht/g droge stof.

De herkomst en de samenstelling van de gasbelletjes kan verschillend zijn. Vaak zijn het gewone luchtbelletjes, die via het beluchtingssysteem of anderszins in het water zijn gebracht. Iedere vorm van turbulentie, bijvoorbeeld het verpompen van retourslib via vijzels of de passage van de overstort naar de nabezinktank, kan tot het ontstaan van luchtbelletjes leiden. Ook bij denitrificatie worden gasbelletjes gevormd (N_2 -gas).

De levensduur van gasbelletjes in actiefslib is normaliter beperkt. Voor zover ze niet naar de atmosfeer ontsnappen, lossen kleine belletjes (25-100 μm) in 10 à 20 min. op in het water. Dit proces wordt enigszins vertraagd als in het water oppervlakte-actieve verbindingen zoals detergenten aanwezig zijn, hetgeen bij communaal afvalwater altijd het geval is. Dit soort verbindingen stabiliseert het grensvlak gas/water om de belletjes, hetgeen de levensduur verlengt. Zo ontstaat schuim.

Het grensvlak om de belletjes wordt echter buitengewoon stevig als hierin, naast oppervlakte-actieve verbindingen, ook kleine hydrofobe deeltjes aanwezig zijn. Hydrofoob wil zeggen: waterafstotend. Een vet oppervlak bijvoorbeeld is hydrofoob. De levensduur van de belletjes wordt dan bijna oneindig en ze kunnen met antischuimprodukten ook niet meer kapot gemaakt worden.

Gram-positieve draadvormende bacteriën hebben meestal een hydrofoob celoppervlak. Deze groep bacteriën speelt dan ook een doorslaggevende rol bij het ontstaan van drijfslagen in communale installaties (tabel 9).

Tabel 9 Resultaten van de bepaling van de Scum Index (SI) met twee actiefslibben.

Slib T : geen draadvormers; SVI = 60 ml/g

Slib B : veel draadvormers; SVI = 200 ml/g.

Slib	Influent (25 vol. %)	SI (%)	SVI ¹⁾ (ml/g)
T	T	0	60
T	B	0	60
B	T	75	75
B	B	48	105

¹⁾ SVI van de fractie die na de flotatietest bezonk.

In deze tabel is de Scum Index (SI) gebruikt als maat voor de flotatiegevoeligheid van het slib. Dit is een test waarbij onder gestandaardiseerde omstandigheden wordt vastgesteld welk percentage van het slib in 10 min. floteert.

Alleen slib B (veel *M. parvicella* draden) floteerde sterk. De fractie die na de test bezonk had bovendien een veel lagere SVI dan het uitgangsmateriaal, hetgeen betekent dat de aanwezige draden grotendeels gefloteerd waren.

11.3 Effect van de populatiegrootte en -samenstelling op de vorming van drijfslagen

In april/mei 1990 is in Nederland een onderzoek uitgevoerd naar de aard en de omvang van drijfslagen op de aëratietank van carrouselinstallaties. De inventarisatie

omvatte circa 70 rwzi's. Het onderzoek werd herhaald in september/oktober van dat jaar.

Bij de mate van drijfslaagvorming op de beluchtingsruimte werden vijf groepen onderscheiden:

- : geen drijfslaag aanwezig;
- ± : 5% van het oppervlak bedekt met een drijfslaag;
- + : 25% van het oppervlak bedekt met een drijfslaag;
- ++ : 50% van het oppervlak bedekt met een drijfslaag;
- +++ : 75-100% van het oppervlak bedekt met een drijfslaag.

Tijdens het voorjaar en het najaar was op 54% respectievelijk 31% van de carroussels een drijfslaag aanwezig (tabel 10). Het percentage rwzi's met een forse drijfslaag (++/+++) daalde tijdens de zomer van 34% tot 12%. Er is dus sprake van een duidelijk seizoenseffect op het voorkomen van drijfslagen.

Tabel 10 Aantal carroussels met een drijfslaag op de aëratietank.

Omvang drijfslaag	Voorjaar		Najaar	
	n rwzi's	%	n rwzi's	%
-	33	46	46	69
±	4	6	10	15
+	10	14	3	5
++	16	23	3	5
+++	8	11	5	7

Tabel 11 laat zien dat de kans op het ontstaan van een drijfslaag groter is naarmate meer draadvormende bacteriën in het slib aanwezig zijn. Vooral tijdens het voorjaar was dit verband zeer uitgesproken; bij een FI > 4 is de kans praktisch 100%. De drijfslaag was meestal ook groter naarmate meer draadvormers in het actief slib aanwezig waren.

Tabel 11 Het verband tussen de Filament Index (FI) van het actiefslib en de aanwezigheid van drijfslagen.

FI	Voorjaar		Najaar	
	n rwzi's	% met drijfslaag ¹⁾	n rwzi's	%
0	0	-	1	0
1	1	0	10	13
2	20	25	27	15
3	22	36	18	22
4	23	87	11	44
5	4	100	0	-

¹⁾ percentage van het aantal rwzi's in de betreffende groep

In tabel 12 worden de filament-indices van de geflooteerde slibben vergeleken met die van de gesuspenderde actiefslibben in dezelfde rwzi's. In de drijfslaag was het aantal draden heel vaak (aanmerkelijk) groter dan in het gesuspenderde slib in de beluchtingsruimte. Incidenteel leek de drijfslaag bijna uit een reïncultuur van draden te bestaan. Er is dus sprake van selectieve flotatie van draadvormende

bacteriën en/of van groei van deze bacteriën in de geflooteerde laag. Ook in kleine drijfslagen waren in het algemeen veel tot zeer veel draden aanwezig.

Tabel 12 FI's van gesuspendeerde en geflooteerde slibben in dezelfde rwzi's.
Opgave in aantal rwzi's.

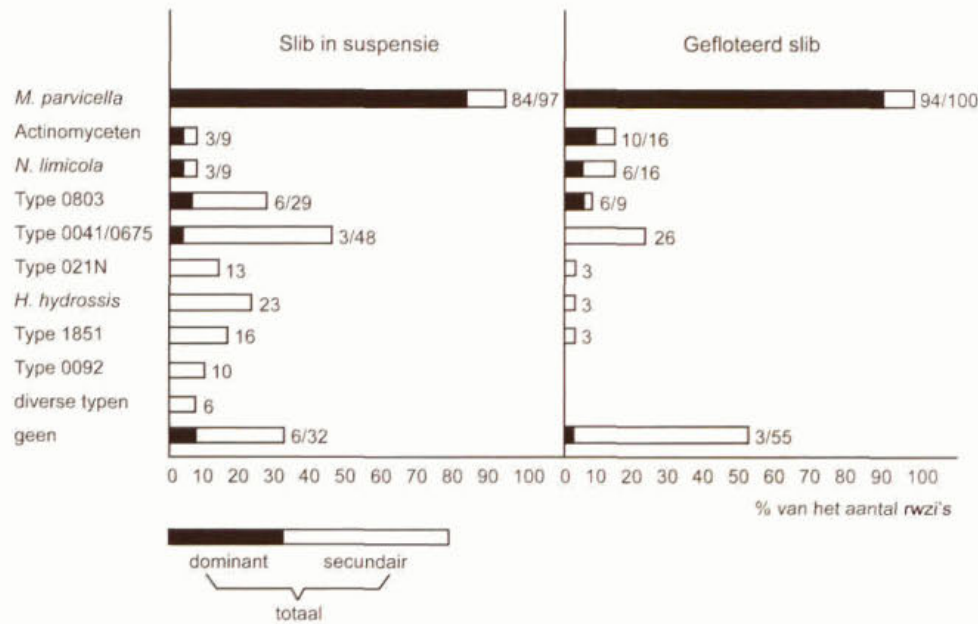
FI	Voorjaar		Najaar	
	gesuspendeerd	geflooteerd	gesuspendeerd	geflooteerd
1	-	-	2	0
2	5	0	6	2
3	6	3	5	3
4	16	6	6	7
5	4	19	0	5
extreem ¹⁾	0	3	0	2

1) bijna een reïncultuur

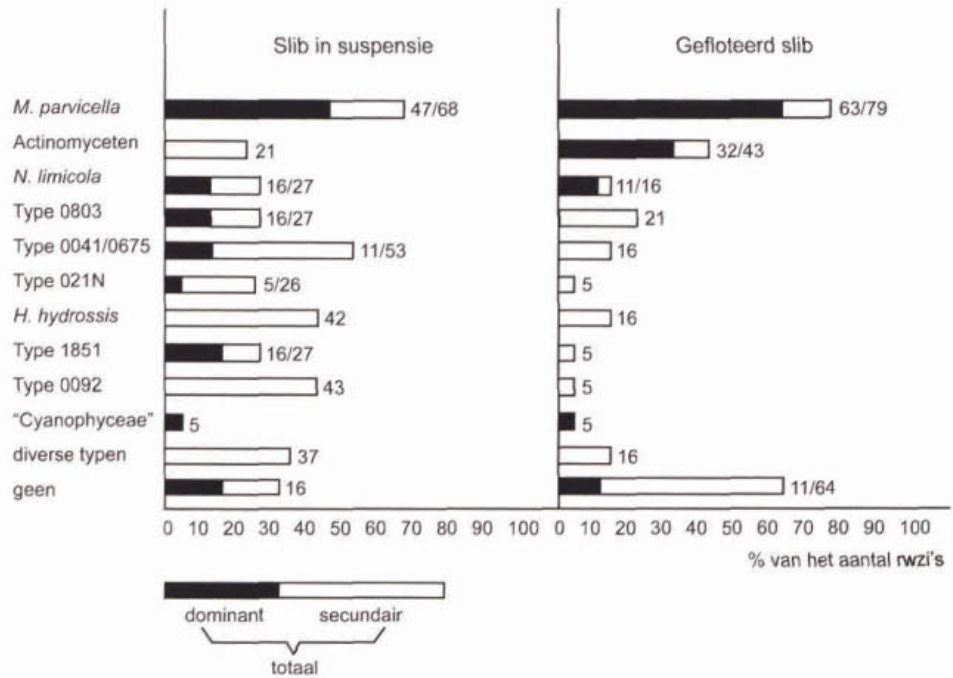
Microscopisch onderzoek wees uit dat vooral *M. parvicella* verantwoordelijk was voor de vorming van drijfslagen in deze rwzi's.

De vergelijking van de populatiesamenstelling in april/mei (figuur 86) van de gesuspendeerde slibben met die van de geflooteerde biomassa toont enkele opmerkelijke verschillen:

- in de drijfslagen was *M. parvicella* nog frequenter dominant aanwezig (van 84% naar 94%);
- ook bij actinomyceten en bij *N. limicola* waren de percentages gestegen;
- alle andere soorten werden in de drijfslagen veel minder frequent waargenomen dan in de gesuspendeerde slibben;
- in liefst 55% van de drijfslagen was in feite maar één soort aanwezig.



Figuur 86 Vergelijking van de populatiesamenstelling van het slib in suspensie met die van het geflooteerde slib in dezelfde rwzi's. Weergave in % van het aantal rwzi's.
Periode: april/mei; n rwzi's= 31



Figuur 87 Vergelijking van de populatiesamenstelling van het slib in suspensie met die van het geflooteerde slib in dezelfde rwzi's. Weergave in % van het aantal rwzi's.
Periode: september/oktober; n rwzi's = 19.

Gedurende het najaar was het verschil tussen deze twee slibben nog groter (figuur 87). Het hoge percentage (32%) geflooteerde slibben waarin actinomyceten domineerden is zeer opmerkelijk. In feite verschijnt deze draadvormer vaak min of meer uit het "niets". In slechts 21% van de actiefslibben werden actinomyceten waargenomen (alleen secundair). Daarentegen waren ze in 32% van de drijfslagen dominant (inclusief secundair: 43%). Dit betekent dat groei van actinomyceten vrijwel onmiddellijk gevolgd wordt door flotatie ($\rightarrow$ extreem flotatiegevoelig). Er zijn landen waar de procentuele bijdrage van actinomyceten aan het ontstaan van drijfslagen aanmerkelijk groter is dan in Nederland (en de rol van *M. parvicella* overeenkomstig kleiner). Het zijn concurrenten om het beschikbare voedsel (de vetfractie uit het influent). Een hogere watertemperatuur en/of een hogere slibbelasting bevoordeelt de actinomyceten bij deze competitie.

Uit deze resultaten blijkt dat alleen *M. parvicella*, actinomyceten en, in beperkte mate, *N. limicola* selectief floteren. Het is zeker niet toevallig dat juist deze organismen zo'n belangrijke rol spelen bij de stabilisering van gasbelletjes en het ontstaan van drijfslagen. Alle drie soorten zijn Gram-positief en dus meestal hydrofoob. Ze voelen zich eigenlijk niet thuis in een watermilieu, hetgeen betekent dat ze het eveneens hydrofobe oppervlak van gasbelletjes prefereren. *M. parvicella* en *N. limicola* vormen flexibele draden, die zich gemakkelijk in een gebogen grensvlak kunnen plooien. Hetzelfde geldt voor de kleine vertakte netwerken van de actinomyceten.

Van de in laagbelaste actief-slibinstallaties gangbare draadvormende bacteriën, zijn ook de Typen 0041/0675 en 1851 Gram-positief. De cellen van deze draadvormers zijn echter door een schede omgeven, waardoor direct contact tussen het celoppervlak en de omgeving verhinderd wordt. De draden zijn bovendien recht en meestal bedekt met gehechte ééncellige bacteriën (aangroei).

Zowel de vetfractie als de micro-organismen die deze consumeren, prefereren het grensvlak gas/water boven de waterfase. Dit komt dus verdacht dicht in de buurt van 'de kat op het spek binden'. Hoewel dit nog niet echt is bewezen, lijkt deze combinatie een belangrijk selectievoordeel te zijn voor sommige draadvormers bij de competitie om de beschikbare voedingsstoffen.

In landen met gematigde temperaturen is het ontstaan van drijfslagen heel sterk aan de groei van *M. parvicella* gekoppeld. Door de seizoensgebonden groei van deze draadvormer, verdwijnen veel drijfslagen tijdens de zomerperiode.

Het introduceren/optimaliseren van nutriëntenverwijdering heeft de concurrentiepositie van *M. parvicella* versterkt, waardoor de drijfslagenproblematiek de laatste jaren in omvang is toegenomen.

11.4 Bestrijden van drijfslagen

Er is een aantal methoden beschikbaar waarmee drijfslagen bestreden kunnen worden, mits het slib niet extreem sterk floteert ($SI < 10-15\%$):

1. Het systematisch afroemen, afvoeren en vernietigen van slib dat op de beluchtingsruimte floteert. Het geflooteerde materiaal mag niet gerecirculeerd worden (b.v. naar de influentkelder), omdat dit tot ophoping van ongewenste bacteriën in de installatie leidt. Afvoer naar de slibgisting wordt ook sterk afgeraden.
2. Het weghalen van het duikschot bij de overloop van de beluchtingsruimte naar de nabezinktank. Geflooteerd materiaal kan dan doorstromen naar de nabezinktank en daar worden afgevangen met bestaande of uitgebreide voorzieningen. Bij de in de vorige paragraaf vermelde studie werd vastgesteld dat tijdens het najaar de aanwezigheid van een duikschot in sterke mate bepalend was voor het al dan niet aanwezig zijn van een drijfslaag op de beluchtingsruimte (geen duikschot: 15% met een drijfslaag; wel een duikschot: 43% met een drijfslaag). Tijdens het vroege voorjaar (*M. parvicella* in een uitstekende conditie en nog relatief snel groeiend) was dit verschil niet significant.
3. Het versproeien van effluent op de drijfslaag. Hiermee wordt geflooteerd materiaal weer gesuspenderd. Het is effectief om in omloopsystemen de opbouw van een drijfslaag in de zone vlak voor de puntbeluchters te voorkomen.

Deze maatregelen zijn echter niet toereikend bij slibben met een $SI > 20-30\%$. Het bestrijden van de verantwoordelijk draadvormers is dan de belangrijkste optie om het probleem op te lossen; zie hoofdstuk 10. Hier wordt volstaan met de opmerking dat de groei van de *M. parvicella* effectief gecontroleerd kan worden via dosering van Al-zouten. Het is nog niet bekend of actinomyceten op dezelfde wijze bestreden kunnen worden.

Het toepassen van flotatie in plaats van bezinken, voor het scheiden van slib en effluent, vormt de tweede mogelijkheid om drijfslagen te bestrijden. Hierbij wordt dan gebruik gemaakt van de flotatiegevoeligheid van het slib. Deze optie is nog niet vaak in de praktijk toegepast. Het inblazen van kleine luchtbelletjes is overigens niet zonder risico. Als deze gestabiliseerd worden en aan de vlok hechten, kan dit tot flotatie van al het slib in de beluchtingstank leiden.

12 Slotopmerkingen

Een beluchtingsruimte is geen tank vol slib, maar een bioreactor met micro-organismen.

Micro-organismen kunnen veel, mits ze netjes worden behandeld.

Micro-organismen werken weliswaar 24 uur per dag en zeven dagen in de week, maar ze doen dit wel in hun eigen tempo → Veranderingen van de populatie kosten soms tijd → Geduld is dus een schone zaak!

13 Literatuur

Voor meer informatie over de biologie en de processtabiliteit van actief-slibinstallaties wordt verwezen naar de hieronder vermelde referenties.

- [1] Andreassen K. and P.H. Nielsen.
In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using micro-autoradiography.
 Wat. Sci. Tech., Vol. 37, 1998, 19-26.

- [2] Blackall, L.L, H. Stratton, D. Bradford, C. Sjörup, T. Del Dot, E.M. Seviour and R.J. Seviour.
 Candidatus *Microthrix parvicella* - a filamentous bacterium from activated sludge sewage plants.
 Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 4, 1996, 344-346.

- [3] Bitton, G.
 Waste water microbiology
 Wiley-Liss Publ. New York, 1994.

- [4] Cloete, T.E. and N.Y.O. Muyima (Eds.).
 Microbial community analysis: The key to the Design of Biological Wastewater Treatment Systems.
 IAWQ, Scientific and Technical Report No. 5, 1997.

- [5] Curds, C.R.
 An illustrated key to the British fresh water ciliated Protozoa commonly found in activated sludge.
 Water Pollution Research Tech. Paper No. 12; Her Majesty's stationary office, London, 1969.

- [6] Eikelboom, D.H.
 Filamentous organisms observed in activated sludge.
 Wat. Res. Vol. 9, 1975, 365-388.

- [7] Eikelboom, D.H.
 Biosorption and prevention of bulking sludge by means of a high floc loading.
 In: Chambers, B. and L.J. Tomlinson (Eds.): Bulking of activated sludge; preventative and remedial methods.
 Ellis Horwood Publ., Chichester, 1982, p. 90-104.

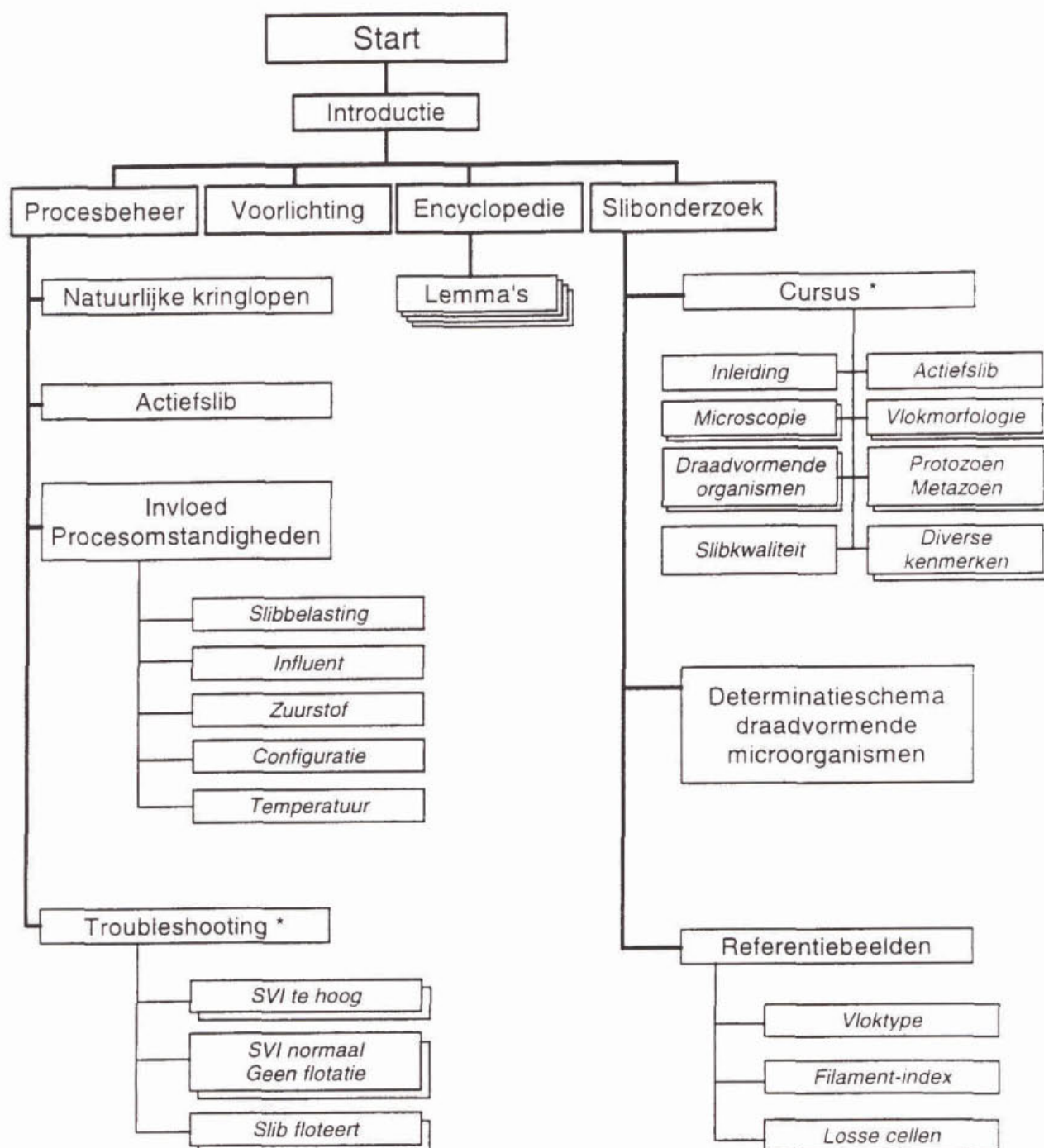
- [8] Eikelboom, D.H.
 Extra toepassingsmogelijkheden voor protozoa en metazoa bij de zuivering van afvalwater.
 MT-TNO, Rapport R 88/286, 1988.

- [9] Eikelboom, D.H.
Handboek voorkomen en bestrijden van licht slib.
STOWA, Utrecht, 1988.
- [10] Eikelboom, D.H.
The *Microthrix parvicella* puzzle.
Wat. Sci. Tech., Vol. 29, 1994, 271-279.
- [11] Eikelboom, D.H., A. Andreadakis and K. Andreasen.
Survey of the filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries.
Wat. Sci. Tech. Vol. 37, 1998, 281-289.
- [12] Janssen, P.M.S en J.H. Rensink.
Handleiding biologische fosfaatverwijdering.
STOWA, Utrecht, 1991.
- [13] Jenkins, D.
Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming.
Wat. Sci. Tech. Vol. 25, 1992, 215-230.
- [14] Jong, P. de, F.A. Visser en C.P. Petri.
Handboek stikstofverwijdering.
STOWA, Utrecht, 1993.
- [15] Lemmer, H. et al. (ATV Arbeitsgruppe 2.6.1).
Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaum in Belebungsanlagen - Ursachen und Bekämpfung.
Korrespondenz Abwasser, Vol. 45, 1998, 1959-1968.
- [16] Lemmer, H., T. Griebe und H.C. Flemming (Hrsg.).
Ökologie der Abwasserorganismen.
Springer Verlag, Berlin, 1996.
- [17] Lemmer, H.
Fadenförmige Mikroorganismen aus belebten Schlamm. Vorkommen - Biologie - Bekämpfung.
ATV Dokumentation und Schriftenreihe aus Wissenschaft und Praxis, Bd. 30, 1992.
- [18] Patterson, D.J.
Free-living fresh water Protozoa: A Colour Guide.
John Wiley Publ., New York, 1992.
- [19] Prendl, L.
Ein Beitrag zu Verständnis und Anwendung Aerober Selektoren für die Blähschlammvermeidung.
Wiener Mitt., 139, 1997.

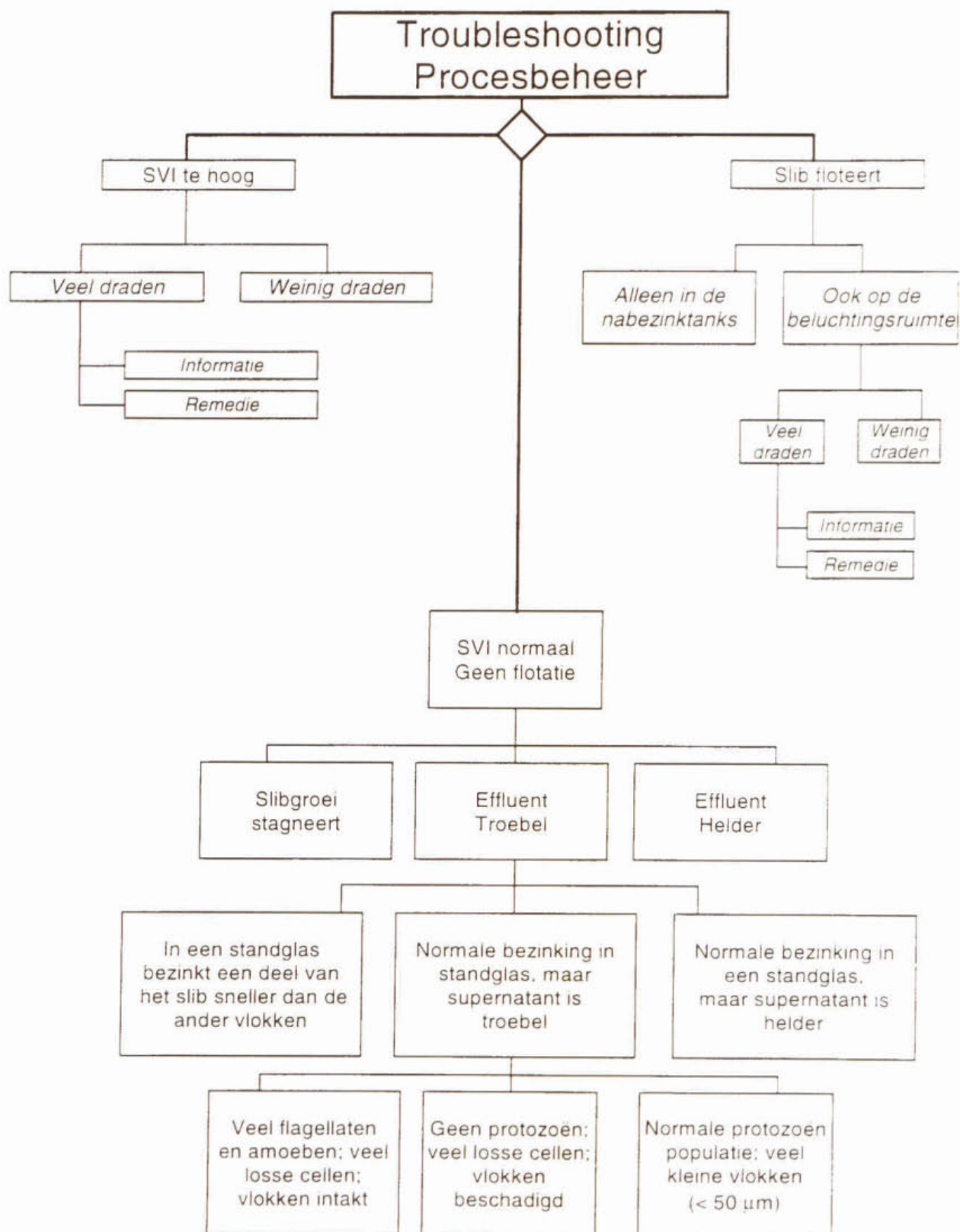
- [20] Sauer, F.
Tiere und Pflanzen im Wassertropfen.
Fauna Verlag, Karsfeld, 1982.
- [21] Slijkhuis, H. and M.H. Deinema.
Effect of environmental conditions on the occurrence of *Microthrix parvicella*
in activated sludge.
Wat. Res., Vol. 22, 1988, 825-828.
- [22] Streble, H. und D. Krauter.
Das Leben im Wassertropfen.
Kosmos Verlag, Stuttgart, 1973.
- [23] Tandoi, V., S. Rosetti, L.L. Blackall and M. Majone.
Some physiological properties of an Italian isolate of *Microthrix parvicella*.
Wat. Sci. Tech. Vol. 37, 1998, 1-8.
- [24] Wanner, J.
Activated sludge bulking and foaming control.
Technomic, Lancaster, 1994.

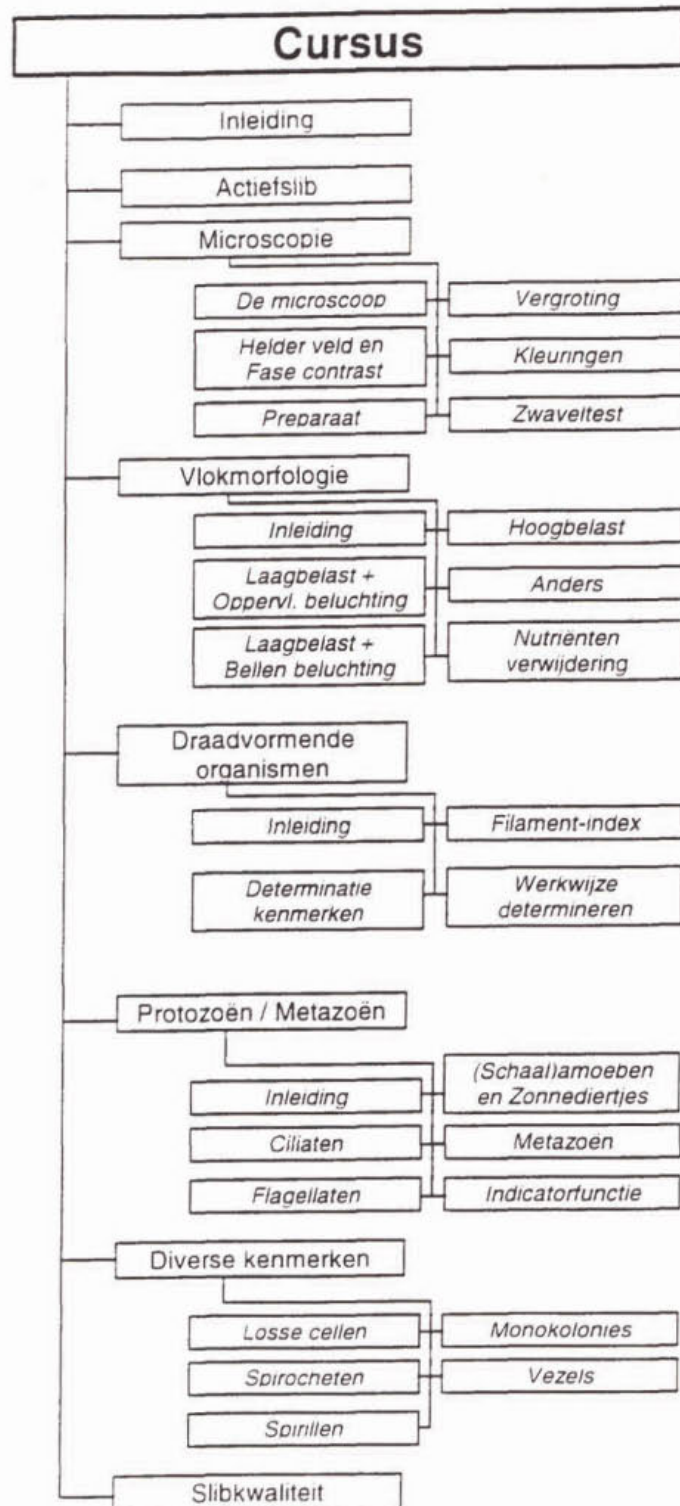
Bijlage A

Procesbeheer van actief-slibinstallaties door microscopisch slibonderzoek Structuur CD- I



* : zie volgende pagina's





Bijlage B Analysestaat voor het noteren van de kenmerken van draadvormende micro-organismen in actief-slib

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

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

Bijlage C Analyseformulier

Resultaat Microscopisch Slibonderzoek

Installatie:

Datum monstername:	Analyse door:
Nummer monster:	Datum analyse:

Slibkwaliteit	
goed	☐
matig	☐
slecht	☐
Trend ¹⁾	
beter	☐
gelijk	☐
slechter	☐
n.v.t.	☐

(kenmerkende foto)

1) in vergelijking met het laatste monster

Draadvormers ^{a)}		FI =		Proto-/Metazoën ^{b)}		Diverse kenmerken	
<i>M. parvicella</i>		Type 021N		Ciliaten		Vloktype ^{d)}	
Type 0041/0675		<i>Thiotrix</i>		Flagellaten		Losse cellen ^{c)}	
Type 0092		<i>S. natans</i>		Amoeben		Zoogloeas ^{b)}	
Type 1851		<i>H. hydrossis</i>		Schaalamoeben		Poly-P-kolonies ^{b)}	
Type 0803		<i>N. limicola</i>		Heliozoën		Andere monokolonies ^{b)}	
Type 0914		Type 1701		Rotiferen		Spirillen ^{b)}	
Actinomyceten				Nematoden		Spirocheten ^{b)}	
		Div. soorten		Wormen		Vezels ^{b)}	

- a) Schaal 0-5 = geen - zeer veel draadvormende organismen
- b) Schaal 0-3 = geen - tientallen cellen/kolonies per preparaat
- c) Schaal 0-3 = geen - honderden cellen per beeldveld
- d) 1 karakteristiek voor lage belastingen + oppervlaktebeluchter
- 2 karakteristiek voor lage belastingen + bellenbeluchting
- 3 karakteristiek voor hoge belastingen
- 4 opvallend veel kleine vlokjes (< ca. 25 µm)
- 5 anders; zie opmerkingen

Opmerkingen:
.....
.....
.....
.....
.....

