De scheiding van slib en plankton

door

M.C. Budding

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 4

13069

De scheiding van slib en plankton

door

M.C. Budding

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 4

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen
slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming v.h. NIOZ

De scheiding van slib en plankton

door

M.C. Budding

intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctorale studie

in het tijdvak van 1972 - 1973

aan

het NIOZ op Texel

voor

Dr. D. Eisma

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN

nummer 1974 - 4

De scheiding van slib en plankton

door

M. C. Budding

Intern verslag

Inhoud

I. Summary 2
Samenvating 2
II. Inleiding en doel van het onderzoek(je) 3
III. Theoretische uitwerking 6
1. Slibgedrag 6
2. Aggregaatbouw 7
3. Plankton 9
4. Centrifugeren 9
5. Centrifuge probleem 1. De dichtheid van klei-aggregaatjes 11
6. Centrifuge probleem 2. Mengaggregaten . . . 13
7. Centrifuge probleem 3. Het effect van "tussen" vloeistof 14
8. Centrifuge probleem 4. Pelletvorming . . . 15
9. Alternatieven 16
10. Controle 17
11. Conclusie 19
IV. Practische uitvoering 20
1. Effectieve dichtheid van slib. Natuurlijk monster 20
2. Proefmonsters. (programmapunt 6) 23
3. Effectieve dichtheid van slib. Proefmonster . 25
4. Mengaggregaten 27
5. Tussenvloeistof 29
6. Kwetsbaarheid van plankton 32
7. Kwantitatieve controle 32
V. Opmerkingen terzijde 35
1. Coulter Counter tellingen 35

2. Veranderingen van het monster buiten de tel- en scheidingsprocedure 36
Bijlage I Bezinker 37
VI. Geraadpleegde Literatuur 38

I. SUMMARY

It is possible to separate non-living suspended matter and living plankton with the help of a common laboratory centrifuge and a commercial silica-gel called LUDOX. With this method it becomes possible to determine particle size of suspended matter and plankton separately with e.g. a Coulter Counter.

The following method has been used. First the particle size distribution of the original (mixed) sample is determined with the Coulter Counter. Then an aliquot is centrifuged in order to concentrate the particles in a smaller volume. Then the concentrated sample is brought into a centrifuge phial that contains a 22% sucrose-solution on top of a layer of LUDOX. The sample is centrifuged during 10 minutes with a velocity of 3500 rotations per minute. After this the non-living particles are concentrated on the bottom of the phial whereas the plankton is concentrated on top of the LUDOX. The plankton is carefully collected and resuspended in (filtered) seawater. Counting this plankton in the Coulter Counter gives the size distribution as it was in the original sample. The size distribution of non-living particles is found by substraction. Counting the non-living particles concentrated on the bottom of the phial will in most cases not give the original size distribution: Complex processes of flocculation and aggregation of clay particles and organic matter probably will take place during concentration and centrifuging, making it necessary to use an indirect method.

SAMENVATTING

Met behulp van een gewone laboratorium-centrifuge en het in de handel verkrijgbare silica-gel LUDOX is het mogelijk in zeewater gesuspendeerd slib en plankton van elkaar te scheiden.

Daardoor wordt het mogelijk de grootteverdeling van de slib- en planktondeeltjes afzonderlijk te bepalen met behulp van automatische (i.c. Coulter Counter-) tellingen.

Allereerst wordt daartoe het gesuspendeerde materiaal, nog in het oorspronkelijke monster verenigd, geteld. Vervolgens wordt het de eerste keer gecentrifugeerd in het "eigen" zeewater, om het te concentreren. Daarna wordt het geconcentreerde materiaal in een

centrifugebuis gebracht, op een laagje 22-procentage sucrose-oplossing, dat zich op zijn beurt op een laag Ludox bevindt. De buis wordt gedurende 10 minuten met een snelheid van 3500 toeren per minuut gecentrifugeerd, waarna het slib zich op de bodem van de buis bevindt, en het plankton op het oppervlak van de Ludox rust. Dit plankton wordt zeer voorzichtig terug gewonnen, en opnieuw in (gefiltreerd) zeewater gesuspendeerd. Telling van deze suspensie geeft de grootteverdeling van het plankton, zoals het in het oorspronkelijke monster aanwezig was. De grootteverdeling van het slib wordt gevonden door de waarden die de laatste telling heeft opgeleverd af te trekken van de waarden uit de eerste telling. Directe telling van de slibdeeltjes onder uit de centrifugebuis levert zeer waarschijnlijk niet de grootteverdeling van het slib zoals het in het oorspronkelijke monster voorkwam op.

Het complexe flocculatie-gedrag van de kleimineralen, waaruit het slib grotendeels bestaat, maakt indirecte telling noodzakelijk.

II. INLEIDING EN DOEL VAN HET ONDERZOEK(JE)

Men kan de mikroskopisch kleine deeltjes die in zeewater zweven in twee groepen verdelen: Plankton, d.w.z. alle levende orgismen (nekton komt in deze afmetingen eigenlijk niet voor), en slib. Het slib zou verder verdeeld kunnen worden in bio-slib, d.w.z. alle niet opgeloste resten en produkten van organismen, en geo-slib, d.w.z. authigeen en terrigeen materiaal, vnl. bestaande uit kleimineralen, kwarts, glimmer en veldspaten.

Bij kwantitatief onderzoek aan deeltjes in suspensie vormde het tellen altijd een probleem. Van een bekende hoeveelheid zeewater werd een bezinkingspreparaat gemaakt, waarin de deeltjes onder de

mikroskoop werden gemeten en geteld: een arbeidsintensieve procedure die de bron vormde van een aanzienlijke fout.

Moderne deeltjes-tellers hebben dit probleem voor een deel opgelost. Voor een deel want deze tellers kunnen de verschillende soorten deeltjes niet van elkaar onderscheiden. Wie alleen maar geïnteresseerd is in één soort deeltjes, kan niet selectief alleen die soort tellen. De andere deeltjes vormen voor hem een lastige verontreiniging. Een des te lastiger verontreiniging, omdat de groepen onderling onafhankelijk en onvoorspelbaar variëren wat betreft aantal en grootte-verdeling van de deeltjes, zodat eenvoudige correcties niet mogelijk zijn.

Bij een NIOZ-projekt wordt kwantitatief onderzoek verricht aan slib in de Noordzee. Verspreid over de Noordzee worden watermonsters genomen, waarvan de slib "inhoud" aan een grootte-analyse wordt onderworpen. Daartoe wordt de gehele "inhoud" van het monster, dus ook het aanwezige plankton, met behulp van een Coulter Counter* per gewenste grootte-klasse geteld. Deze Coulter Counter telt de werkelijke volumina die de deeltjes in zeewater innemen, een veel betere methode dan de in de sedimentologie veel gebruikte zeeftellingen. Het maakt de correctie van de telling op plankton echter niet gemakkelijker. Voor deze correctie wordt het plankton nl. in een bezinkingspreparaat onder de mikroskoop per grootte-klasse geteld. En per grootte-klasse tellen wil dan zeggen, dat het volume van ieder, vaak grillig gevormd plankton deeltjes moet worden geschat, rekening houdende met alle uitsteeksels en instulpingen.

* Coulter Counter, Industrial Model B, Dual threshold;
Coulter Electronics Limited, Dunstable, Bedfordshire, England.

Het is dan ook niet verwonderlijk dat de NIOZ-onderzoekers ook deze laatste "hand"telling graag zouden vermijden.

Als we uitvinden van nieuwe elektronische telapparatuur, die plankton wel van slib kan onderscheiden, even buiten beschouwing laten, dan kan die "hand"telling alleen worden vermeden door het op de één of andere manier elimineren van het plankton in het monster. Maar dan wel op zo'n manier, dat de volumina van de slib-deeltjes niet veranderen, want daar is immers alles om begonnen.

Aan die laatste voorwaarde blijkt niet makkelijk te voldoen. Het grootste deel van het slib bestaat nl. uit kleimineralen, die in het zeewater tot aggregaatjes uitgevlokt zijn. De afmetingen van die aggregaatjes kunnen met bijna iedere eigenschap van het zee-water veranderen: pH, temperatuur, concentratie van verschillende stoffen in oplossing en suspensie, enz. Daardoor zijn alle chemische methoden ter eliminatie van het plankton al bijvoorbaat ongeschikt. De gedachten van de NIOZ-onderzoekers gingen dan ook uit naar een fysische methode: Centrifugeren.

Het zoeken naar een methode om, met behulp van een centrifuge, plankton van slib te scheiden is dan ook het doel van dit onder-zoekje. Hoofdvoorwaarde waaraan de te vinden methode dus zal moeten voldoen is, dat er ondanks de nodige bewerkingen, inzicht in de grootte-verdeling van de slib deeltjes verkregen kan worden zoals die in het oorspronkelijke monster voorkwam.

III. THEORETISCHE UITWERKING

Het doel van de te vinden methode is dus het vereenvoudigen van de slibtelling. Daartoe zullen de monsters met hun "inhoud" een aantal bewerkingen moeten ondergaan. Om te weten te komen welke bewerkingen we wel, en welke we niet mogen uitvoeren, lijkt het nuttig de mogelijke reacties van de "inhoud" op millieuveranderingen nader te bekijken.

1. Slibgedrag

Een groot deel van het geo-slib bestaat uit aggregaten van kleimineralen. Deze aggregaten zijn te beschouwen als uitgevlokte colloidale kleideeltjes. De groote van de aggregaten, of de mate van flocculatie, blijkt een weinig stabiele zaak, en zo complex, dat de hele colloidchemie van kleimineralen er bij om de hoek komt kijken. We zullen ons beperken tot enige direct relevante gegevens, die ons misschien wat verder zullen helpen. Het voor ons belangrijkste onderzoek werd verricht door U.G. WHITEHOUSE en enige anderen (1953, 1954, 1955, 1958, 1960). Samenvattend zegt WHITEHOUSE (1960) :

"Clay minerals are not transported and do not settle as single solid grains or in irreversible solid states of aggregation in saline water. The settling unit is a thermodynamicaly reversible assembly of solid grains or threads, in association with occluded water and water of hydration"

Na een serie onderzoekingen komt hij tot de conclusie, dat de mate van flocculatie in ieder geval afhankelijk is van de volgende eigenschappen van het medium: chloriniteit, temperatuur, pH, ionic strength (een combinatie van ionenconcentratie en -valentie), en de concentratie van de stoffen in suspensie.

Bovendien blijkt, dat de invloed van deze factoren per kleimineraal verschilt. Een aantal zaken, die we wel graag zouden willen weten blijft onduidelijk: Bij hun onderzoek wijzigden WHITEHOUSE c.s. steeds maar één factor; de andere werden angstvallig constant gehouden. Wat er gebeurt, wanneer meer factoren tegelijkertijd veranderen is niet duidelijk. Evenmin duidelijk is, hoe kleimengsels met verschillende samenstellingen reageren. Tenslotte is het onbekend, hoe "reversible" de "assembly of solid grains or threads" in feite is. Uit publikaties van BUNGENBERG DE JONG & KRUYT (1930) en O'BRIEN (1970) blijkt, dat de aggregaatjes soms aanzienlijke tijd nodig hebben om zich aan de veranderde omstandigheden aan te passen.

Daar ook andere literatuur geen verdere gegevens hierover oplevert, kunnen we vaststellen, dat de klei-aggregaatjes behoorlijke veranderingen kunnen ondergaan maar dat we niet weten hoe snel en in welke mate verschillende kleimengsels op verschillende veranderingen tegelijkertijd reageren. Voor ons onderzoekje betekent dit, dat we, om zuivere tellingen te krijgen, dus eigenlijk óf niet fysisch-chemisch aan de slibmonsters moeten sleutelen, óf het effect van iedere aangebrachte verandering moeten controleren. Keuze van de laatste mogelijkheid zou wel eens een elefantiasisachtige aandoeninging voor het onderzoekje kunnen betekenen.

2. Aggregaatbouw

Omdat de kleimineralen in het geo-slib moeilijkheden gaan opleveren, is enige informatie over de bouw van de aggregaatjes misschien nuttig. Onder de mikroskoop zijn ze te zien als wolkige, onscherp begrensde lichamen. Bij het raadplegen van de literatuur over de interne struktuur van deze lichamen vormt de moderne technologie

een grote steun: toepassing van de stereo-scan en de hoog-voltage electronen-mikroskoop heeft alle wat oudere literatuur achterhaald, zodat deze kan worden vergeten.

Recent onderzoek met behulp van deze apparatuur door O'BRIEN (1970) aan uitgevlokte illiet en kaoliniet, laat zien, dat de wolkige aggregaten zijn samengesteld uit een poreus netwerk van massievere eenheden: clusters. Deze cluster op hun beurt blijken opgebouwd uit traptree-gewijs "cheek-to-cheek" tegen elkaar liggende plaatvormige kleikristallen. Behalve "cheek-to-cheek" kontakten komen er tussen de kleiplaatjes ook vlakrand kontakten voor (zie Fig. 3 en 4).

De clusters onderling zijn door dergelijke kontakten verbonden. Daar de plaatjes door van der Waals krachten, die evenredig met de kontakt-oppervlakte toenemen, aan elkaar verbonden zijn, vormen deze vlakrand kontakten de zwakke punten in de bouwsels. Het geheel lijkt op een kaartenhuis.

Zonder twijfel bestaat er verband tussen de bouw van de aggregaten en het flocculatie gedrag. Misschien tussen de lengte van de "cheek-to-cheek" gekoppelde clusters en de mate van flocculatie, of tussen de verhouding van de twee soorten kontakten binnen een aggregaat en de mate van flocculatie. Gegevens hierover zijn niet bekend. Evenmin bekend is het effect van mechanische inwerking op de bouwsels, bijvoorbeeld tijdens een ultrasoon-behandeling van het monster. De informatie, die we hebben maakt het waarschijnlijk, dat bij een dergelijke behandeling de vlak-rand kontakten als eerste worden verbroken. En dat kon, als er in de aggregaatjes echt mechanisch ingesloten water voor zou komen, wel eens konsekwenties hebben voor hun dichtheid.

3. Plankton

Het plankton is een veel makkerlijker te hanteren materiaal. Er treden geen flocculatie problemen op, bovendien is de grootte-verdeling ervan voor ons niet belangrijk. Wanneer we het plankton toch willen tellen, bijvoorbeeld voor controle, dan moeten we met de volgende moeilijkheden rekening houden: In media met osmotische waarden die van die van zeewater verschillen, kan de omvang van de cellen veranderen: bij een lagere osmotische waarde gaan de cellen zwellen, bij een hogere inkrimpen. Bovendien kunnen de uitwendige kiezel skeletjes van diatomeeën (het meest voorkomende Noorzee-plankton) in oplossing gaan als het monster oud wordt, of als ze in een basisch milieu terecht komen (pH hoger dan 8). Tenslotte kunnen ketens van meer cellen aan elkaar en tere uitsteeksels van organismen afbreken door zeer ruwe behandeling.

4. Centrifugeren

De algemene theorie over sedimentatie in de centrifuge is bekend (SVEDBERG & PETERSEN, 1940). De centrifugaalkracht die op een bolvormig deeltje word uitgeoefend kan geschreven worden als:

$$4/3\pi r^3(d-d_o)\omega^2 x \qquad (1)$$

waarin r de straal van het deeltje voorstelt,

d de dichtheid van het deeltje,

d_o de dichtheid van het medium,

ω de hoeksnelheid, en

x de afstand van het deeltje tot het rotatie centrum.

Wanneer in de centrifugebuis een evenwichtssituatie is bereikt, is deze centrifugaalkracht gelijk aan de wrijvingsweerstand die het deeltje ondervindt.

Deze wrijvingsweerstand kan geschreven worden als

$$6\pi\eta r \frac{dx}{dt} \qquad (2)$$

waarin η de viscositeit van het medium voorstelt, en t de tijd. Uit (1) volgt, dat de uitgeoefende centrifugaalkracht gelijk is aan nul, wanneer $d = d_o$, en dat deze negatief wordt, wanneer d kleiner is dan d_o, d.w.z. dat het deeltje dan een centripetaalkracht ondervindt.

Het "enige" wat ons dus te doen staat is de dichtheid van plankton (d_1) met die van slib (d_2) te vergelijken, en daarna een medium te zoeken waarvoor geldt $d_1 < d_o < d_2$. Als slib inderdaad een grotere dichtheid heeft dan plankton, dan zal dat laatste zich, bij centrifugeren van een monster op dit medium, als pellet verzamelen op het grensvlak zeewater - medium, terwijl het slib een pellet vormt op de bodem van de buis.

Nu is de dichtheid van een stof in het algemeen niet hetzelfde als de dichtheid van die stof tijdens het centrifugeren. Dit verschil wordt o.a. veroorzaakt door de afwijking van de bolvorm van de deeltjes, en door de aanwezigheid van geadsorbeerde ionen aan die deeltjes. Deze dichtheid in de centrifuge wordt effectieve dichtheid genoemd, en moet voor de meeste stoffen experimenteel gevonden worden.

<u>De dichtheid van plankton</u>

De effectieve dichtheid van het plankton bleek een makkelijk achterhaalbaar gegeven. Volgens mondelinge mededelingen van biologen met ervaring in deze materie varieert het een beetje, maar ligt het altijd onder 1,25.

<u>De dichtheid van slib</u>

De effectieve dichtheid van slib leverde meer moeilijkheden op. Ten

eerste gaan de verschillen tussen geo- en bio-slib een rol spelen. Het bio-slib blijkt uit twee "dichtheidskomponenten" te bestaan: Er zijn schaal- en skeletresten, opgebouwd uit anorganische verbindingen, met een dichtheid groter dan 2. Daarnaast zijn er de rottende (organische) resten van celwanden, protoplasten en vooral houtweefsel, die in het zelfde dichtheidsbereik vallen als plankton.

Deze lichte en zware komponent zullen bij het centrifugeren onvermijdelijk van elkaar gescheiden worden. De organische resten zullen in het plankton-pellet terecht komen, terwijl de schaal- en skeletresten zich bij het geo-slib op de bodem van de buis zullen verzamelen. Voor het NIOZ-onderzoek vormt dit echter geen bezwaar. Het gaat slechts om een klein percentage van het slib als totaal; hooguit verandert de definitie van het onderzochte materiaal een beetje.

Het geo-slib bestaat deels uit minerale korrels, deels uit klei-aggregaten. De effectieve dichtheid van de minerale korrels zal weinig van de normale dichtheid afwijken, en ligt in ieder geval boven 2.

5. Centrifuge probleem 1. De dichtheid van klei-aggregaatjes.
De dichtheid van droge kleimineralen ligt ook boven 2, maar het is bekend, dat de effectieve dichtheid van in een electrolyt uitgevlokte klei lager kan zijn, en bovendien variabel is. Voor die verlaging kan de afwijking van de bolvorm niet alleen aansprakelijk worden gesteld.

Volgens WHITEHOUSE c.s. (1960) gedraagt een agglomeraatje zich mét de er aan gebonden en de er opgesloten moleculen uit het medium als één hydrodynamische eenheid. De dichtheid van zo'n eenheid wordt volgens hem bepaald door de electro-chemische

eigenschappen van het medium. Fig. 6 geeft dit vereenvoudigd weer.

Ook het volume van de water-met-ionen mantel om het deeltje heen wordt kennelijk door dezelfde eigenschappen bepaald.

Of de klei-aggregaatjes in onze monsters dicht genoeg zijn zullen we moeten uitproberen. Als dit niet het geval blijkt is er misschien een methode om de dichtheid te verhogen: Uit het model van WHITEHOUSE c.s. wordt niet duidelijk welke rol het ingesloten water speelt. Is dit ook electro-chemisch aan de klei gebonden, of wordt het (deels?) mechanisch opgesloten? In de hier boven beschreven poreuze netwerken van O'BRIEN lijkt dat laatste zeer goed mogelijk. Door de bouw van de netwerken zou de vrije uitwisseling van het er in aanwezige water met het "buiten" water effectief beperkt kunnen worden, zodat het op die manier ingesloten water inderdaad meetelt bij de dichtheid van het deeltje als geheel. Als dit het geval is (er zijn recente gegevens die hierop wijzen), dan zou het tijdelijk herstellen van de communicatie tussen "buiten" en "binnen" water de dichtheid verhogen. Die communicatie kan misschien hersteld worden, door het monster zodanig ultrasoon te behandelen, dat alleen de zwakke vlak-rand kontakten in de bouwsels verbroken worden, en de cheek-to-cheek kontakten intact blijven. Natuurlijk zou ook het effect van de ultrasoon-behandeling op de deeltjes-grootte nagegaan moeten worden.

Programma punten

1. De effectieve dichtheid van de klei-aggregaatijes in de Noordzee monsters bepalen.
2. Als die dichtheid niet voldoende boven die van plankton ligt, het effect van een ultrasoonbehandeling uitproberen.

Dan ook:

(2a. De gevolgen voor de deeltjes-grootte van deze ultrasoon-behandeling nagaan).

6. Centrifuge probleem 2. Mengaggregaten

In een bezinkings-preparaat zijn onder de mikroskoop zo nu en dan klei-aggregaten te zien, waarin een organisme zit. Het is mogelijk, dat dit veroorzaakt wordt door het na elkaar bezinken van een aggregaatje, het organisme, en weer een aggregaatje. Maar het is ook mogelijk, dat dergelijke mengaggregaten in natuurlijk zeewater voorkomen. Als dat het geval is kunnen ze moeilijkheden bij het centrifugeren gaan opleveren; Hun dichtheid kan dan nl., afhankelijk van de volume verhouding van de beide komponenten, overal liggen tussen die van het slib en van het plankton. En ergens in deze reeks willen we door centrifugeren de scheiding aan brengen.
We zullen het antwoord moeten vinden op de volgende vragen:

a. Komen dit soort mengaggregaten inderdaad in de monsters voor vóór het bezinken?, en zo ja:
b. Zit het plankton zo stevig aan het slib, dat de mengaggregaten tijdens het centrifugeren intact blijven? en zo ja:
c. Zijn de componenten op één of andere manier van elkaar te scheiden, zonder dat de oorspronkelijke grootteverdeling van de deeltjes verloren gaat (bijvoorbeeld alweer door een ultrasoon behandeling)?

Als het antwoord op vraag b. negatief is, wordt vraag a. irrelevant. Wanneer het plankton alleen al door centrifugeren van het slib los laat zullen in ieder geval met een centrifuge-methode geen kwantitatieve gegevens over de mengaggregaten verkregen kunnen worden. We moeten dan accepteren, dat een klein percentage van de slibdeeltjes die we tellen (nl. de resten van de mengaggregaten) oorspronkelijk in andere, niet achterhaalbare, vorm in suspensie voorkwam.

Zowel vraag a. als vraag b. kunnen dus beantwoord worden door een monster op een gradient van naar onder toe geleidelijk dichter

wordende vloeistoffen te centrifugeren. Als zich twee duidelijk gescheiden pellets vormen, één slib- en één plankton-pellet, waartussen zich geen materiaal bevindt, vervalt probleem 2.
Bovendien is dan ook programmapunt 1 van bladz. 12 uitgevoerd.

Als het antwoord op vraag b. positief blijkt te zijn, is het niet waarschijnlijk, dat vraag c. ook positief beantwoord kan worden. Een dergelijke scheidingsmethode zal bijna zeker een grotere fout opleveren in de grootteverdeling van de overige deeltjes, dan de fout, die het verlies van een gedeelte van de mengaggregaten zonder scheiding zou veroorzaken.

Programma punten
1.x Door het centrifugeren van een monster op een gradient vaststellen of er centrifuge-bestendige mengaggregaten in voorkomen.

3. Als deze voorkomen een methode proberen te vinden, waarmee het plankton van de aggregaatje kan worden losgemaakt, zonder dat de oorspronkelijke grootteverdeling van het slib in gevaar komt (waarschijnlijk te combineren met programmapunt 2. van bladz. 12).

7. Centrifuge probleem 3. Het effect van "tussen"vloeistof.
Wanneer de effectieve dichtheden van slib en plankton voldoende ver uiteen liggen om scheiding d.m.v. centrifugeren mogelijk te maken, moet een vloeistof gezocht worden met een dichtheid groter dan die van plankton en kleiner dan die van slib. De slibdeeltjes zullen deze vloeistof dus moeten passeren, waarbij zich alle al besproken flocculatie problemen kunnen voordoen. Om zeker te zijn, dat de afmetingen van de klei-aggregaatjes tijdens het contact met deze vloeistof niet veranderen, zou deze vloeistof fysisch-chemisch identiek moeten zijn met zeewater. Daar we in ieder geval een stof

met een hogere dichtheid moeten hebben, is dat bijvoorbaat onmogelijk. Maar hij zal onvermijdelijk ook in andere eigenschappen van zeewater verschillen. Voor dit probleem bestaat geen directe oplossing. Het enige dat gedaan kan worden is een tussenvloeistof zoeken, die de deeltjesgrootte van de kleimineralen zo min mogelijk verandert. Hopelijk zijn de veranderingen erg klein door het korte contact, maar dat zal moeten worden vastgesteld.

8. Centrifuge probleem 4. Pelletvorming.

Behalve door de eigenschappen van de tussenvloeistof ondergaat het slib tijdens het centrifugeren nog een fysisch-chemische verandering. Als alles naar wens gaat verzamelt het slib zich als pellet onder in die centrifugebuis. In die pellet is de concentratie van de kleimineralen natuurlijk veel hoger, dan in het oorspronkelijke monster. De deeltjes worden zelfs door de centrifugaal kracht tegen elkaar aan gedrukt. Hier heersen kortom de ideale omstandigheden voor het vormen van grote aggregaten. Het effect van de tussenvloeistof zal waarschijnlijk in het niet vallen bij wat er in het pellet kan gebeuren. Ook dit is een moeilijk oplosbaar probleem. Het zou voor een deel opgelost kunnen worden door het slib niet op de bodem van de buis op te vangen, maar op een zeer nauwkeurig opgebouwde gradient, zodat het slib opgevangen wordt verspreid over een traject van langzaam toenemende dichtheid.

Maar daarmee is het probleem niet volledig opgelost: ook dan neemt de concentratie van de kleimineralen toe. De chemische eigenschappen van de vloeistoffen uit de gradient zullen opnieuw de flocculatie beïnvloeden. Bovendien zal het terugwinnen van alle materiaal (voor de telling) worden bemoeilijkt.

9. Alternatieven

Bij de praktische uitvoering zullen zich ongetwijfeld nog meer problemen voordoen. Maar de al voorshands gesignaleerde moeilijkheden geven reden genoeg tot pessimisme. De instabiliteit van de klei-aggregaten blijft een groot struikelblok.

Er zijn echter twee alternatieve mogelijkheden, die perspectieven bieden. In de eerste plaats kan misschien juist de reversibiliteit van klei-flocculatie, die zoveel moeilijkheden oplevert, tot een oplossing leiden. Als die reversibiliteit tenminste groot genoeg is. In dat geval zouden de deeltjes, die door de bewerkingen van grootte zijn veranderd, weer tot hun oorspronkelijke afmeting kunnen worden teruggebracht, door ze voor het tellen weer in zeewater te suspenderen, dat precies dezelfde eigenschappen heeft als het oorspronkelijke monster. Zelfs zou daar een niet gebruikt deel van het oorspronkelijke monster voor gebruikt kunnen worden, dat dan natuurlijk gefiltreerd moet worden.

Er zal moeten worden nagegaan, of de reversibiliteit hiervoor inderdaad groot genoeg is, en hoeveeltijd er eventueel mee gemoeid is om de oorspronkelijke toestand te herstellen.

De tweede mogelijkheid biedt nog meer perspectief:
Om de grootte-verdeling van de slibdeeltjes te weten te komen hoeft niet persé het bewerkte slibpellet geteld te worden. De grootteverdeling kan ook indirect gevonden worden, door vóór iedere bewerking de gehele inhoud van het monster te tellen, slib en plankton, en na het centrifugeren alleenhet planktonpellet. Eenvoudig aftrekken levert dan de grootteverdeling van het slib in het oorspronkelijke monster op!

Alle veranderingen die het slib tijdens het centrifugeren ondergaat zijn daarmee onbelangrijk geworden; de misschien onoplosbare

centrifuge-problemen 3 en 4 zijn omzeild.

Natuurlijk moet er ook bij deze oplossing aan bepaalde voorwaarden worden voldaan: De afmetingen van het plankton moeten tijdens het centrifugeren constant worden gehouden. Dat betekent, dat:

a. Het plankton alleen in aanraking mag komen met vloeistoffen, die ten opzichte van de cellen isotoon zijn;
b. De monsters niet te oud mogen worden, en niet in een millieu met een pH hoger dan 8 terecht mogen komen, omdat in beide gevallen de kiezel skeletjes van de diatomeeën in oplossing kunnen gaan; en
c. De monsters niet aan een te ruwe behandeling mogen worden blootgesteld, omdat daardoor de cellenketens en tere uitsteeksels kunnen breken.

Samenvattend levert dat de volgende programmapunten op:

4. Een vloeistof zoeken, die dezelfde osmotische waarde heeft als zeewater, de kiezel skeletjes van de diatomeeën niet aantast, en een dichtheid heeft tussen die van slib en plankton in.
5. In verband met een eventueel nodige ultrasoon behandeling bepalen wat het plankton kan hebben, voordat de ketens en uitsteeksel afbreken.

10. Controle.

Tijdens en na de uitvoering van het praktische programma zal moeten worden gecontroleerd, of de geproduceerde pellets inderdaad maar één component bevatten. Dat kan met de planktonmikroskoop gebeuren, of met de polarisatie-mikroskoop. De laatste heeft het voordeel, dat minerale korrels en kleiaggregaten door hun interferentie kleuren kunnen worden geïdentificeerd en onderscheiden van onduidelijk bio-materiaal, maar het nadeel, dat met van onderen doorvallend

licht moet worden gewerkt. Bovendien moet het te onderzoeken materiaal in druppels op het object-glaasje worden gebracht. Voor weinig geconcentreerd materiaal vormt dat laatste wel een ernstig bezwaar. De eventueel aanwezige mengaggregaten bijvoorbeeld, worden bij programmapunt 1* misschien zo over de gradient verspreid, dat ze in een druppel nauwelijks zijn terug te vinden, of zo gering in aantal zijn, dat er geen algemene conclusies aan mogen worden verbonden.

Aan het eind van het onderzoekje moet de hele, hopelijk gevonden procedure worden gecontroleerd. Het beste kan daarbij worden uitgegaan van een monster, waarvan zowel de aantalen slib- als plankton-deeltjes per grootte klasse bekend zijn. Nadat dit monster de gehele procedure heeft ondergaan, moet de grootteverdeling in de daardoor gevormde pellets bij telling overeenkomen met de beide oorspronkelijke grootteverdelingen.

Een bekend monster kan worden verkregen, door van een deel van een willekeurig monster een bezinkingspreparaat te maken, en dat door een ervaren teller te laten tellen. Dat heeft enige bezwaren. Ten eerste zijn we dan voor de verhouding slib - plankton afhankelijk van de toevallige samenstelling van dat monster, terwijl het juist erg handig kan zijn, bijv. om de procedure onder "extreme" omstandigheden te testen, om die verhouding zelf te kunnen bepalen. Ten tweede wordt het later herhalen van de procedure onder precies dezelfde omstandigheden bij gebruik van willekeurige monsters onmogelijk. Ten derde heeft ieder teller ondanks zijn ervaring een persoonlijke fout, die, gezien de gecompliceerde schattingen, bij deze telling wel eens aanzienlijk zou kunnen zijn.

Het verdient daarom de voorkeur om bij het experimenteren uit te gaan van kunstmatige proefmonsters, waarvan we de samenstelling

zelf kunnen regelen. Deze kunnen worden gemaakt, door pure klei en zuiver plankton in de gewenste verhouding samen te voegen in gefiltreerd zeewater. De beide componenten kunnen tevoren apart geteld worden met de Coulter Counter, maar het is ook mogelijk, oom van bekende, goed gehomogeniseerde grootte-populaties klei en plankton telkens zoveel te nemen, dat men zeker kan zijn van dezelfde grootteverdeling als in de voorraad aanwezig is.

Programma punten: 6. Kunstmatige proefmonsters samenstellen.

7. Aan het eind van het onderzoekje een proefmonster van bekende samenstelling aan de volledige scheidingsprocedure onderwerpen, en de geproduceerde pellets op grootteverdeling controleren.

11. Conclusie

Of het zoeken naar een centrifuge-methode zinvol is, zal moeten blijken uit het resultaat van programmapunt 1. Wanneer er inderdaad voldoende verschil in effectieve dichtheid tussen slib en plankton bestaat, zal aan de hand van de verdere programmapunten moeten worden bepaald, hoe de scheidingsprocedure dient te worden uitgevoerd. Naar alle waarschijnlijkheid kunnen deze programmapunten niet allemaal door een enkelvoudig experiment worden verwezenlijkt. Er zullen zich ongetwijfeld problemen voordoen, die niet zijn voorzien. Ze kunnen echter wel dienen als kapstok waaraan het practische onderzoekje kan worden opgehangen.

Volledigheidshalve worden ze hieronder nog eens herhaald:

1.(en 1*) Door het centrifugeren van een monster op een sucrose gradient de effectieve dichtheid van het slib vaststellen en controleren of er centrifugebestendige mengaggregaten voorkomen.

2. Als de effectieve dichtheid van slib niet voldoende boven die van plankton ligt, het effect van een ultrasoon behandeling uitproberen. Dan ook:

(2a. De gevolgen voor de deeltjesgrootte van deze ultrasoon behandeling nagaan).

3. Als centrifuge-bestendige mengaggregaten voorkomen, een methode proberen te vinden om plankton en klei in die mengaggregaatjes van elkaar te scheiden (bijv. een ultrasoonbehandeling). Dan ook:

(3a. De gevolgen van die scheiding voor de deeltjesgrootte nagaan).

4. Een "tussen"vloeistof zoeken, die a. dezelfde osmotische waarde heeft als zeewater, b. de kiezelskeletjes van de diatomeeën niet aantast, en c. een dichtheid heeft tussen die van slib en plankton in.

5. In verband met eventueel nodige ultrasoon behandeling bepalen wat het plankton kan hebben, voordat de ketens en tere uitsteeksels afbreken.

6. Kunstmatige proefmonsters samenstellen.

7. De uiteindelijke gevonden procedure op een monster van bekende (deeltjesgrootte-) samenstelling toepassen, en de geproduceerde pellets op grootte-verdeling controleren.

IV. PRACTISCHE UITVOERING

1. Effectieve dichtheid van slib. Natuurlijk monster.

Voor de uitvoering van programmapunt 1. werd een monster zeewater uit de haven van het NIOZ op Texel op een sucrose gradient gecentrifugeerd. De gradient was opgebouw uit vier sucrose oplossingen, met van boven naar beneden de volgende dichtheden: 1,25; 1,30; 1,35; en 1,40. Als de dichtheid van alle slib groter dan 1,40 mocht blijken, is de preciese waarde verde niet van belang; scheiding is dan zonder meer mogelijk.

De eerste poging leverde weinig succes op. In dit stadium van het onderzoekje werd gebruik gemaakt van een centrifuge met geringe capaciteit: Nadat de gradient in de buis was gebracht, paste daar nog maar 20 ml monster bovenop. Die 20 ml. bevatte zo weinig gesuspendeerd materiaal, dat dat na het centrifugeren niet meer in de sucrose was terug te vinden.

Om dit bezwaar te ondervangen werd de "inhoud" van een liter zeewater in de centrifuge versneld gesedimenteerd. Het op die manier geconcentreerde materiaal werd vervolgens op de gradient gebracht.

Dit leverde een onverwacht resultaat op: Na tien minuten draaien bij 4000 toeren per minuut bleek vrijwel alle materiaal op de bodem van de buis te liggen. Met moeite was ook op het grensvlak zeewater sucrose-1,25, en in de sucrose-1,25 enig materiaal te ontwaren.

Dit betekende weliswaar, dat een groot deel van het materiaal een dichtheid groter dan 1,40 bezat, maar over de samenstelling van het minder dichte materiaal kon niets zinnigs worden gezegd: Zelfs het terugwinnen van dat materiaal voor een controle-preparaat zou al een heel grote relatieve fout kunnen opleveren, terwijl controle van dat beetje materiaal statistisch weinig kon betekenen.

Het bodem pellet bleek geen plankton te bevatten, en wel kleiaggregaatjes. Bovendien zaten daar nogal wat naaldvormige zeer doorzichtige lichaampjes in, die later artefacten bleken, ontstaan door het gebruikt van sucrose.

Later bleek eveneens, dat dit monster door seizoen invloed inderdaad bijna geen plankton bevatte.

Toch leverde dit experiment enige interessante gegevens op:

In de eerste plaats werd duidelijk, dat het ook in dit stadium

al zinvoller was met kunstmatige proefmonsters te werken, dan afhankelijk te zijn van de toevallige samenstelling van natuurlijke monsters. Ten tweede was gebleken, dat in ieder geval een groot deel van de klei-aggregaten een dichtheid groter dan 1,40 bezit. Ten derde, en dat was van belang voor de gehele, later te volgen procedure, werd duidelijk, dat werken met materiaal in de natuurlijke concentratie niet was aan te bevelen: Bij het terugwinnen van een pellet kan materiaal verloren gaan, bij kleine pellets evenveel als bij grote, maar bij de laatste levert dit verlies een veel kleinere relatieve fout op. Daarom is het raadzaam om, vóór de scheidingsprocedure, maar na de eerste telling, het gesuspendeerde materiaal (m.b.v. een centrifuge) te concentreren, zodat tijdens het scheiden met zoveel mogelijk materiaal per buis gewerkt kan worden.

Behalve statistisch juistere tellingen zou deze extra bewerking nog twee voordelen opleveren: Er kan met centrifuges van geringere capaciteit gewerkt worden, en er wordt "schoon" zeewater met precies de goede eigenschappen verkregen, om het pellet voor de eindtelling in te suspenderen.

(Het is niet aannemelijk, dat deze extra bewerking het uiteindelijke telresultaat ongunstig zou beinvloeden. Alleen het plankton moet nog worden geteld, en dat is zeker centrifuge bestendig. Hooguit zou ook hierbij wat materiaal verloren kunnen gaan, maar dan in evenredige hoeveelheden van beide componenten. Dit verlies zou bij de eindcontrole (programmapunt 7), als van twee kwantitatief bekende componenten wordt uitgegaan, moeten blijken).

Algemene conclusie 1. Bij de uiteindelijke scheidingsprocedure verdient het aanbeveling het te onderzoeken materiaal tijdens de bewerkingen nodig voor het scheiden (en alleen dan) in geconcentreerde vorm te gebruiken.

2. Proefmonsters (programmapunt 6)

Het was dus beter, om voor de herhaling van de proef eerst proefmonsters samen te stellen. Daarvoor waren drie componenten nodig: Slib, plankton en gefiltreerd zeewater.

a. Slib. Voor de slib-componenten konden we volstaan met dat deel ervan dat moeilijkheden opleverde: De kleimineralen. Omdat verschillende kleimineralen verschillend flocculatiegedrag vertonen, werd gezocht naar een kleimengsel, waarin dezelde mineralen voorkwamen als in Noordzee slib. Gekozen werd tenslotte een in het Geol. Inst. in Leiden aanwezige klei, die bestond uit vnl. kaoliniet, montmorilloniet en illiet, met daarbij een klein percentage ijzeroxide.

Door de aanwezigheid van dit ijzeroxide was de klei fel rood van kleur. Ook in geringe concentraties in vloeistoffen gesuspendeerd, vertoonden die een rood waas. Bij het verdere onderzoek bleek dit een groot voordeel: Het maakte het mogelijk centrifugeproeven voorlopig ook met het blote oog te controleren.

De klei was afkomstig van zeefanalyses, en had (per kleidefinitie) een "natte"korrelgrootte <2 mu, maar was bij droging samengeklonterd tot veel grotere korrels.

Om het kleivoorkomen in het proefmonster zo natuurlijk mogelijk te maken, werden deze korrels eerst met de hand fijn gemaakt, en vervolgens in zeewater gesuspendeerd. De zo gevormde suspensie werd daarna minimaal 48 uur bewaard, onder voortdurend roeren. Dit bleek lang genoeg, om aggregaten met een diameter van 60 mu te vormen.

Daar het gebruikte kleimengsel tijdens de laboratorium bewerking van alle organische stof was ontdaan, en in natuurlijk Noordzee slib organische complexen een rol spelen bij de flocculatie, werden in de loop van het onderzoek bij sommige proeven dergelijke organische stoffen aan de proefmonsters toegevoegd. Voor dít onderzoek bleek dit geen verschillende resultaten op te leveren, zodat daar verder niet op in wordt gegaan.

b. Plankton. Puur plankton bleek veel lastiger te verkrijgen. Overal in Nederland werd geinformeerd naar een diatomeeën kweek, maar die was in eerste instnatie niet te vinden.

Vervolgens werd besloten dan maar plankton te vangen met behulp van een plankton net. Dit zou wel in zo helder mogelijk water moeten gebeuren, om zo weinig mogelijk slib mee te vangen. Daar het alweer laat in het seizoen was, werden eerst deskundigen geraadpleegd over de plaats waar nog levend plankton gevangen kon worden. De Oosterschelde bleek de beste kansen te bieden, en dat kwam bijzonder goed overeen met de gestelde helder-water eis.

Het Delta Instituut in Yerseke verleende alle medewerking, waaronder het gebruik van een schip. Met behulp van 60 mu planktonnetten werden enorme hoeveelheden oppervlakte water van grote helderheid gezeefd.

Het zo verkregen plankton had twee nadelen: a. Organismen kleiner dan 60 mu ontbraken, en b. Omdanks de zorgvuldig gekozen helder water localiteit kwam er toch enig geoslib in voor (hieronder waren enkele voor dit stroomregiem opmerkelijk grote kwartskorrels).

In een later stadium kon toch nog de hand worden gelegd op een diatomeeën-kweek. Het is een mislukte coccolieten-kweek van Dr. P. WESTBROEK en zijn geo-biochemische werkgroep in Leiden.

De coccolieten waren door het gebruik van onvoldoende gezuiverd zeewater door diatomeeën overwoekerd.

Alle aanvankelijk met Oosterschelde-plankton uitgevoerde proeven werden later met dit materiaal herhaald.

Conservering van plankton in de proefmonsters vond plaats op dezelfde manier als in de Noordzee monsters: door toevoeging van volgens NIOZ-recept bereide JKJ oplossing in ijsazijn.

c. Gefiltreerd zeewater. Het verkrijgen van deze component leverde natuurlijk geen enkele moeilijkheid op. Overigens werd in sommige niet kwantitatieve experimenten geen gebruik gemaakt van gefiltreerd zeewater, maar van zeewater waaruit door het lange staan alle gesuspendeerde materiaal was bezonken. De hierin misschien aanwezige deeltjes kleiner dan 1 mu vormden geen bezwaar.

3. Effectieve dichtheid van slib. Proefmonster.

Programmapunt 1 werd nu herhaald met een proefmonster i.p.v. een natuurlijk monster op de gradient.

Dit monster proef bevatte ongeveer gelijke delen Oosterschelde plankton en rode klei, samengevoegd in weinig zeewater.

Opnieuw werd 10 minuten gedraaid bij 3500 toeren per minuut, en het resultaat was prachtig: Op de bodem van de buis een fel rood kleipellet, en boven in de buis een bruingroen planktonpellet, zonder ook maar een vleugje rood.

Met dat bovenste pellet was echter iets aan de hand: Het was niet echt één pellet. Het grensvlak zeewater-sucrose was niet meer scherp te zien. Waarschijnlijk was er, door onregelmatig draaien tijdens het afremmen van de centrifuge, versnelde diffusie opgetreden, en had zich een menglaagje gevormd.

Het merendeel van het materiaal bevond zich in dat menglaagje

Bij microscopische controle bleek het voor een groot deel uit plankton te bestaan, zoals verwacht. Klei ontbrak geheel, maar wel was er moeilijk te identificeren materiaal aanwezig, dat onder de microscoop op klei leek. Ook bij grote vergrotingen vertoonde het echter niet de minste dubbelbreking. Bovendien bleek het zonder meer in waterstofperoxide (6%) op te lossen, zodat we concludeerden met het organische deel van het bio-slib te doen te hebben (zie bl. 11).

Dit deel van het planktonpellet was dus in orde.

Een tweede "subpellet" bevond zich hoger in de buis, boven de mengzone. Het bevatte veel minder materiaal, dat sterk op het zojuist beschreven bioslib leek. In de bruinige lichaampjes waren langwerpige verdichtingen zichtbaar, die het geheel een vezelig aanzien verleenden. Hier en daar waren celachtige structuren te zien. Ook dit materiaal loste op in 6% waterstofperoide. Daar verdere indentificatie binnen dit onderzoekje te ver zou voeren, werd ook dit materiaal organisch bio-slib genoemd. (Het leek overigens heel goed mogelijk dat het hier om ontbindend houtweefsel ging).

Tenslotte kwamen er in de buis, drijvend op de oppervlakte van het zeewater, een aantal donkere bolletjes voor, in grootte varierend van 200 tot 60 mu. Zij waren volstrekt opaak, alleen aan de randen hier en daar bruin doorschijnend. Ook zij gingen in 6% waterstofperoxide in oplossing, zij het langzamer. De dichtheid (lager dan zeewater) mede in aanmerking genomen, leek het ons waarschijnlijk dat we hier met teer-partikeltjes te doen hadden.

Het planktonpellet als geheel was dus in orde.

De mikroskopische controle van het slibpellet gaf ook bevredigend resultaat. Het bleek geen plankton te bevatten. Wel, naast natuurlijk de rode klei, een kwartskorrel (80 mu!) en enige lege diatomeeën skeletjes.

De scheidingsresultaten van deze proef waren dus zonder meer bevredigend, maar daarenboven waren enige interessante gegevens over het Oosterschelde slib naar voren gekomen: Het waarschijnlijk voorkomen van teerpartikeltjes in afmetingen kleiner dan tot nu toe beschreven; het voorkomen van grote kwartskorrels in zo diep (12 m) en zo helder water; en het zo overvloedig voorkomen van organisch bio-slib. Dit laatste kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan een combinatie van twee oorzaken: het seizoen en de masswijdte van het net. Veel wieren (en oeverriet ?) waren al aan het afsterven, en leverden rottingsmateriaal. Het nog aanwezige phytoplankton was al veel minder talrijk geworden, en werd bovendien maar zeer gedeeltelijk, nl. voor zover groter dan 60 mu, gevangen. Onder dergelijke omstandigheden is het niet verwonderlijk, dat het rottingsmateriaal relatief veel in het gevangen materiaal voorkomt.

Om een eventueel grootte-effect op de effectieve dichtheid van het plankton uit te sluiten werd de proef later herhaald met een proefmonster, dat naast rode klei, gekweekte diatomeeën bevatte (diameter vnl. tussen 15 en 40 mu). De resultaten waren zo mogelijk nog beter: Het plankton vormde nu echt één pellet boven in de buis.

Algemene Conclusie 2. Het verschil in effectieve dichtheid van plankton (1,25) en slib (1,40) is groot genoeg om deze zonder meer d.m.v. centrifugeren van elkaar te scheiden.
(programmapunt 2 (2a) kan komen te vervallen)

4. Mengaggregaten

In beide hierboven beschreven proeven werd alle materiaal gescheiden in twee dichtheidsgroepen. In de gradient daartussen bevond zich geen materiaal. Bij de laatste proef, met gekweekte diatomeeën, was

dat ook niet te verwachten: Het plankton was al dood toen het bij de klei werd gevoegd. Maar bij de eerste proef, met Oosterschelde plankton, konden weldegelijk mengaggregaten worden verwacht, als die tenminste bestaan. Hun ontbreken daar was dus wel van betekenis. Maar omdat ook dit tamelijk bijzonder materiaal was, werd de proef later herhaald met in het voorjaar gemonsterd Noordzeewater.
Uit een bezinkingspreparaat hiervan bleek dat ongeveer 20% van het in suspensie aanwezige materiaal uit plankton bestond. Dit materiaal werd na concentratie op een fijner verdeelde gradient gecentrifugeerd: Dichtheden 1,25; 1,28; 1,35; 1,38; 1,40.
Het aldus gevormde planktonpellet werd afgepipetteerd, met de sucrose -1,25 waarna de sucrose tót en met -1,38 zorgvuldig werd teruggewonnen en in gefiltreerd zeewater verdund, tot de dichtheid van de oplossing als geheel $\pm$ 1,10 bedroeg.

Als er deeltjes met intermediaire dichtheden aanwezig waren, moesten die zich nu in deze oplossing bevinden. En dan zou het ook mogelijk moeten zijndie in een bezinkingspreparaat zichtbaar te maken.

Daar conventionele bezinkingspreparaten met de polarisatie-microscoop niet kunnen worden bekeken, en omdat tijdens het in Leiden uitgevoerde deel van het onderzoekje niet regelmatig over een planktonmicroscoop kon worden beschikt werd een toestelletje geconstrueerd, waarme ook voor de polarisatie-microscoop geschikte bezinkingspreparaten konden worden gemaakt. (Zie bijlage "Bezinker").

De verdunde sucrose-oplossing met eventuele mengaggregaten werd in deze "bezinker" gebracht, en gedurende 48 uur met rust gelaten. Na deze periode bleek er inderdaad enig materiaal bezonken te zijn, maar geen mengaggregaten en geen plankton. Wel een vezel met hoge interferentie kleuren, waarschijnlijk afkomstig van in het laboratorium gebruikte kleenex-tussue. Ook een aantal zeer kleine

kleideeltjes, allen kleiner dan 1 mu, waarvoor de centrifugeertijd bij de toegepaste draaisnelheid waarschijnlijk te kort was geweest, maar die in ieder geval buiten het telbereik van de Coulter Counter vielen. Natuurlijk betekent dit niet dat het bestaan van mengagregaten nu afdoend is weerlegd, maar voorzover binnen dit onderzoekje mogelijk is aangetoond, dat we bij het scheiden geen rekening met deeltjes van intermediaire dichtheden hoeven te houden.

Algemene conclusie 3. Het scheiden van slib en plankton d.m.v. centrifugeren wordt niet bemoeilijkt door het voorkomen van centrifuge-destendige mengaggregaten. Bewerkingen om dergelijke moeilijkheden op te heffen (programmapunten 3 en 3a) kunnen dus achterwege blijven.

5. Tussenvloeistof

Zoals in programmapunt 4 werd geformuleerd, moest de tussenvloeistof aan drie voorwaarden voldoen: a. Hij zou isotoon moeten zijn t.o.v. het plankton; b. hij zou de kiezelskeletjes van diatomeeën niet mogen aantasten; en c. hij moest een dichtheid hebben tussen die van slib en plankton in.

Uit de centrifugeproeven was inmiddels gebleken wat voorwaarde c. in dichtheidswaarden wilde zeggen: de dichtheid van de tussenvloeistof zou groter moeten zijn dan, aan de veilige kant 1,28 en mocht in ieder geval nog 1,40 bedragen. Binnen dit bereik moest dus een vloeistof gevonden, die ook aan de voorwaarden a en b voldeed.

De meest voor de hand liggende vloeistof was natuurlijk de al gebruikte sucrose-oplossing. Bij de al uitgevoerde proeven was gebleken, dat de kiezelskeletjes er zonder gevaar mee in contact gebracht konden worden; de dichtheid was naar believen met de

concentratie te varieren; alleen de osmotische waarde moest nog worden gecontroleerd. Het was duidelijk, dat die met de concentratie zou toenemen. De vraag was dus, of de osmotische waarde van sucrose-1,28 voor ons doel nog laag genoeg was. Om die vraag te beantwoorden werd de "osmotische kromme" van sucrose-oplossingen met toenemende concentratie bepaald.

Daartoe mocht gebruik worden gemaakt van de osmometer van de Afdeling Electronen Microscopie van het Academisch Ziekenhuis in Leiden. De resultaten zijn te zien in figuur 7. Punten geven de gemeten waarden aan; de kromme, die een rechte bleek, werd door interpolatie verkregen. Zoals uit de figuur blijkt, is sucrose als niet bruikbaar. Een 22 procentage sucrose-oplossing is isotoon met zeewater, maar deze haalt lang niet gevraagde dichtheidsbereik.

Er moest dus naar een andere stof worden gezocht. Omdat het in de biologie en de biochemie niet ongebruikelijk moest zijn om met t.o.v. plantcellen isotone vloeistoffen te werken, werd daar geinformeerd.

Er bleken hoofdzaakelijk twee dergelijke stoffen te worden gebruikt, die in de handel verkrijgbaar waren: Ludox en Honda. Honda bleek met een dichtheid van 1,18 voor ons doel ongeschikt.

Ludox, met een dichtheid van 1,40, was precies wat we nodig hadden. Het bleek een silicagel te zijn. Om de silicadeeltjes in suspensie te houden heeft het een pH van $\pm$ 9. Dwz., dat de silica(!) -skeletjes van de diatomeeën in gevaar konden komen.

Om dit bezwaar op te heffen werd eerst geprobeert de ludox voor gebruik aan te zuren tot een pH van 7,5. Dit bleek mogelijk door onder sterk roeren HCl 10 N voorzichtig toe te voegen. Bij langzaam roeren vlokte het gel om de druppeltjes HCl direct uit. Met aangezuurde ludox kon korte tijd gewerkt worden, na langere tijd

werd de silica kristallijn.

Later, bleek, dat de diatomeeën ook bij contact met niet aangezuurde Ludox geen, althans met de Coulter Counter registreerbare, schade opliepen. (Waarschijnlijk omdat het suspensie-medium van de Ludox van Silica was verzadigd).

(Daar diatomeeën over het algemeen veruit het belangrijkste deel van het plankton uitmaken, is tot nu toe alleen aandacht besteed aan de mogelijke oplossing van hun skeletjes. Daar chitine pantsertjes of cellulose celwanden door het gebruik van Ludox ook niet in gevaar komen, wordt daarop verder niet ingegaan).

Bij experimenten met proefmonsters op Ludox kwam een ander bezwaar er van aan het licht: Zodra het zeewater van het monster met het Ludox-oppervlak in contact kwam, nam de viscositeit van de Ludox daar zo sterk toe, dat een gelei-achtige korst ontstond, waar ook het slib tijdens het centrifugeren niet meer door heen kon dringen.

Dit bezwaar werd opgeheven door op de Ludox eerst een laagje 22-procentige sucrose-oplossing (vanwege de isotonie) te brengen, en pas daarop het monster.

Een laatste bezwaar van de Ludox kwam bij het terugwinnen van het plankton-pellet naar voren. Daar het plankton s.l. (nl. met het organisch bioslib) geen uniforme dichtheid bezit, vormden zich bij centrifugeren op Ludox en sucrose doorgaans twee "subpellets", één op het grensvlak zeewater-sucrose, en éénop het grensvlak sucrose-Ludox. Terugwinnen van het bovenste "subpellet" bleek in het algemeen geen moeilijkheden op te leveren, terugwinnen van het tweede wel: de planktondeeltjes rustten op de Ludox. Wanneer er bij het afpipetteren ook een beetje Ludox meekwam veranderde dat bij het weer in suspensie brengen van het plankton (voor de eindtelling) ogenblikkelijk in artefacten, die door de

Coulter Counter natuurlijk werden meegeteld.

Ter oplossing hiervan werd de "klop-veeg-zuig-truc" toegepast. Nadat alle zeewater en het bovenste subpellet was afgepipetteerd, werd in de sucrose een tweede pipet gebracht, gevuld met dezelfde sucrose-oplossing. Door telkens een beetje sucrose uit deze tweede pipet te laten stromen kan het plankton van het Ludoxoppervlak worden opgewerveld, en met de ander pipet opgezogen, zonder dat deze in de buurt komt van het Ludox oppervlak.

Met enige handigheid toegepast blijkt Ludox dus aan alle voorwaarden voor een bruikbare tussenstof te voldoen, zodat we kunnen concluderen:

Algemene conclusie 4. Het silica-gel Ludox voldoet aan alle voorwaarden die in programmapunt 4 werden gesteld, en kan bij het centrifugeren als tussenvloeistof worden gebruikt, mits op deze Ludox een laag 22-procentige sucrose wordt aangebracht, en bij het terugwinnen van het planktonpellet de nodige voorzorgen in acht worden genomen.

6. Kwetsbaarheid van Plankton

Daar ultrasoon-behandelingen van de monsters voor de scheiding van het materiaal niet nodig bleken, kon onderzoek naar de gevolgen daarvan (programmapunt 5) achterwege blijven. Daar de NIOZ-opdrachtgevers toch geinteresseerd waren in ultrasoon-effecten, zal daar in Hoofdstuk V nog enige aandacht worden besteed.

7. Kwantitatieve Controle

Dit deel van het onderzoekje, dat misschien wel het belangrijkste was, leverde relatief weinig moeilijkheden op. De hele procedure werd uitgevoerd. Allereerst werd een hoeveelheid plankton in een

liter gefiltreerd zeewater gesuspendeerd. Deze deeltjes werden met behulp van de Coulter Counter per grootte klasse geteld.

Vervolgens werd van een "grote" hoeveelheid goed gehomogeniseerde rode klei een histogram gemaakt (drie series C.C. tellingen van willekeurige monsters van deze klei). Daarna werd van deze klei, waarvan de verhoudingen van de verschillende korrelgrootte-klassen nu bekent waren, een hoeveelheid bij de al getelde planktonsuspensie gevoegd. Daarbij moest er op worden gelet, dat het totaal aantal deeltjes in suspensie het C.C. maximum niet overtrof (de C.C. kan onbeperkt veel deeltjes tegelijk tellen).
Dit mengsel, het proefmonster, werd opnieuw per grootteklasse geteld, waarna berekend werd hoe groot de toename per grootteklasse was, door het bijvoegen van de klei. Deze toename moest kwalitatief overeenkomen met eerder samengestelde histogram van de klei. Dit bleek goed te kloppen (zie Fig. 8).

De hoeveelheden slib en plankton per grootteklasse waren nu voor het proefmonster afzonderlijk bekend.

Alle gesuspendeerde materiaal in het proefmonster werd vervolgens met een centrifuge geconcentreerd, en het pellet in een inmiddels voorbereïde centrifugebuis overgebracht.

Deze centrifugebuis bevatte, op een laag Ludox, een laag 22-procentige sucrose-oplossing. Daarop werd het pellet "gelegd". Na 10 minuten draaien bij 3500 toeren per minuut werd het daardoor gevormde plankton-pellet op de boven omschreven omzichtige manier teruggewonnen. Dit materiaal werd opnieuw in "leeg"zeewater verdund, tot het volume gelijk was aan dat van het oorspronkelijke proefmonster, en vervolgens met de C.C. geteld. De resultaten van die telling waren, zoals Figuur 9 laat zien zonder meer bevredigend.

Bij de laatste telling, dus na alle bewerkingen, werd iets minder plankton in de kleine korrelgroottes geteld dan bij de eerste plankton telling. Deze afwijking is niet groter dan de maximale fout van de C.C., maar zou ook verklaard kunnen worden door de aanwezigheid van wat zwaarder materiaal in de diatomeeën kweek (anorganisch bio-slib?).

Onbevredigend was natuurlijk, dat de hele controle-procedure maar één keer werd uitgevoerd, en dan nog alleen maar met proefmonsters (natuurlijke monsters werden overigens wel aan de scheidingsprocedure onderworpen en daarna microscopisch gecontroleerd, met eveneens goed resultaat). Deze onvoldoende controle werd veroorzaakt door het feit dat het grootste deel van het onderzoek in Leiden werd uitgevoerd, terwijl alleen op Texel over een C.C. kon worden beschikt. Ondanks toezeggingen kon een in het Biochemisch Laboratorium in Leiden N.B. ongebruikt staande C.C. door onwil van een autoriteitje niet worden gebruikt. Daardoor moesten alle tellingen voor de eindcontrole, ook die voor de samenstelling van de histogrammen in twee dagen op Texel worden gedaan.

Een bezwaar van de grafisch weergegeven telresultaten is, dat de diameters van de deeltjes niet in metrische waarden zijn opgegeven, maar in C.C. eenheden. Deze corresponderen echter lineair met metrische waarden. De omrekenings factor (callibration factor k) was tijdens het uitwerken niet beschikbaar.

Eindconclusie: Ondanks de hierboven beschreven onvolkomenheden mag toch wel als aangetoond worden beschouwd, dat in zeewater gesuspendeerd plankton en slib met een gewone laboratorium centrifuge van elkaar kunnen worden gescheiden.

Als de bij dit onderzoekje gevonden procedure wordt gevolgd is het daardoor mogelijk alleen met behulp van Coulter Counter tellingen een deeltjesgrootte analyse van slib te maken, zoals dat in zeewater voorkomt.

V. OPMERKINGEN TERZIJDE

1. Coulter Counter tellingen

Hoewel de ervaren gebruiker met de C.C. goede resultaten kan verkrijgen, deden zich tijdens dit onderzoekje bij het tellen enige merkwaardige verschijnselen voor.

a. Wanneer tijdens het tellen het monster opraakte, en nieuwe suspensie werd toegevoegd, gaven de eerstvolgende tellingen onder overigens identieke omstandigheden doorgaans aanzienlijke afwijkingen te zien. (soms 50 % minder materiaal in een grootteklasse dan voor het bijvullen!).
   Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn, dat zich ondanks de (zeer onhandig af te stellen) roerder in het bekerglas van de C.C. toch een zekere zonering van het gesuspendeerde materiaal voordoet.

b. De aantallen deeltjes van een bepaalde grootteklasse weken bij telling met een 100 mu telbuis aanzienlijk af van diezelfde deeltjes bij telling met een 280 mu telbuis. De 100mu buis telde telkens aanzienlijk meer deeltjes in een bepaalde grootteklasse dan de 280 mu buis. Weliswaar is de in de handleiding aangegeven nauwkeurigheid van de 280 mu buis indergelijke gevallen veel lager dan die van de 100 mu buis, de verschillen zijn toch te groot, om als de handleiding juist is, alleen aan die geringere nauwkeurigheid toegeschreven te kunnen worden.

Omdat de oorzaak van dit verschijnsel niet bekend was, werden in de figuren steeds de gegevens van beide buizen weergegeven.

2. Veranderingen van het monster buiten de tel- en scheidingsprocedure

Ook voordat het monster aan enige bewerking wordt onderworpen, kunnen al veranderingen zijn op getreden in de grootte van de deeltjes. Al eerder is gewezen op de mogelijkheid, dat de diatomeeën skeletjes door lang bewaren van het monster schade kunnen oplopen. In hoeverre hier rekening mee moet worden gehouden is in dit onderzoekje niet nagegaan.

Een andere serieuze verandering van het materiaal kan eveneens door lang staan optreden: tijdens het staan van het monster sedimenteren de klei-aggregaten. Het is niet waarschijnlijk, dat hun grootte tijdens die sedimentatie onaangetast blijft. De concentratie van het gesuspendeerde materiaal, één van de voor de flocculatie bepalende factoren, wordt in het bezinksel natuurlijk veel groter.

Het effect van "statijd" werd bij enige monsters nagegaan. Daartoe werd een monster gedurende enige tijd (doorgaans 2 uur) krachtig geroerd, en direct daarna geteld. Vervolgens werd het monster 24 uur met rust gelaten, waarna het, na even roeren, opnieuw werd geteld.

De resultaten van de tellingen zijn in Fig. 10 te zien. Voor bruikbare conclusies waren de proeven echter te summier.

Een derde mogelijke oorzaak van foute tellingen is het mogelijke verlies van materiaal dat optreedt door het aan het glas kleven van kleideeltjes. Hieraan is tijdens het onderzoekje geen aandacht besteed. Wel kan aan de hand van de gegevens van de controletelling worden vastgesteld, dat dit verschijnsel in ieder geval tijdens de

procedure geen rol van betekenis speelt.

BIJLAGE I BEZINKER

Het grootste nadeel van de polarisatiemicroscoop bij het bestuderen van deeltjes uit suspensie was het feit, dat telkens slechts één druppel van het medium op een objectglassje kon worden bekeken.

On dit nadeel te ondervangen werd de "bezinker" geconstrueerd, die het mogelijk maakte ook met van onderen doorvallend licht materiaal uit grotere hoeveelheden medium te onderzoeken.

Daartoe werd op de metaaldraaibank een ± 1 mm dik ringetje van een hardplastic buis afgedraaid.

Dit ringetje werd met de vlakke kant d.m.v. araldiet op een objectglassje gelijmd, en vervolgens als een slijpplaatje afgeslepen tot een dikte van 40 mu.

Daarna werd van dezelfde plastic buis een stuk van 5 cm gezaagd, waarvan de vlakke onderkant zorgvuldig werd gepolijst. In die gepolijste onderkant werd vervolgens een radiaal gootje geslepen, waarna de binnenkant van de buis bij de "uitmonding" van dit gootje schuin werd afgevijld. Figuur 12 laat het resultaat min of meer zien.

De zo bewerkte buis werd vervolgens met glycerine op het ringetje bevestigd, zó dat de verbinding waterdicht werd. Het zorgvuldig glycerine-vrij gehouding gootje werd nu met een passend staafje afdicht, waarna het te onderzoeken monster in de buis werd gegoten. Na de noodzakelijke bezinkingstijd werd het staafje voorzichtig (deels) uit het gootje verwijderd, waarna het medium zeer langzaam kon wegstromen, terwijl het te onderzoeken materiaal binnen het ringetje op het objectglaasje achterbleef. Door de schuin weggevijlde binnenkant van de buis was het mogelijk het water

laminair weg to laten stromen, zonder dat het bezonken materiaal werd op-gewerveld. Na het weglopen van het medium kon de buis worden weggenomen, en indien gewenst, een dekglaasje op het ringetje worden gelegd. Het monster was nu "microscoopgereed".

VI. GERAADPLEEGDE LITERATUUR

BUNGENBERG DE JONG, H.G. & H.R. KRUYT, 1930. Koazervation (Entmischung in Colloiden Systemen): - Kolloid Z. 50: 39-48.

EINSTEIN, A., 1911. Berichtigung zu meiner Arbeit: "Eine neue bestimmung der Molekuldimensionen" - Ann. Physik, 38: 591-592.

KRUYT, H.R., 1952. Colloid Science. 1 ; 2. Elsevier, New York.

OLPHEN, H. VAN, 1963. An introduction to clay colloid chemistry. Wiley, New York.

O'BRIEN, N.R., 1971. Fabric of Kaolinite and Illite Floccules. In: Clays and Clay minerals, 19: 345-352.

SHELDON, R.W. & T.R. PARSONS, 1967. A practical manual on the use of the Coulter Counter in Marine Science. Coulter Counter Electronic Sales Co., Toronto.

WALKER, P.H. & J. HUTKA, 1971. Use of the Coulter Counter (Model B) for Particle-size analysis of soils. - Techn. Paper Div. Soils, C.S.I.R.O. Aust. 1: 39.

WHITEHOUSE, U.G., L.M. FEFFREY & J.D. DEBRECHT, 1960. Differential Settling Tendencies of Clay Minerals in Saline Waters. Proc. VII Nat. Conf. on Clays and Clay minerals.

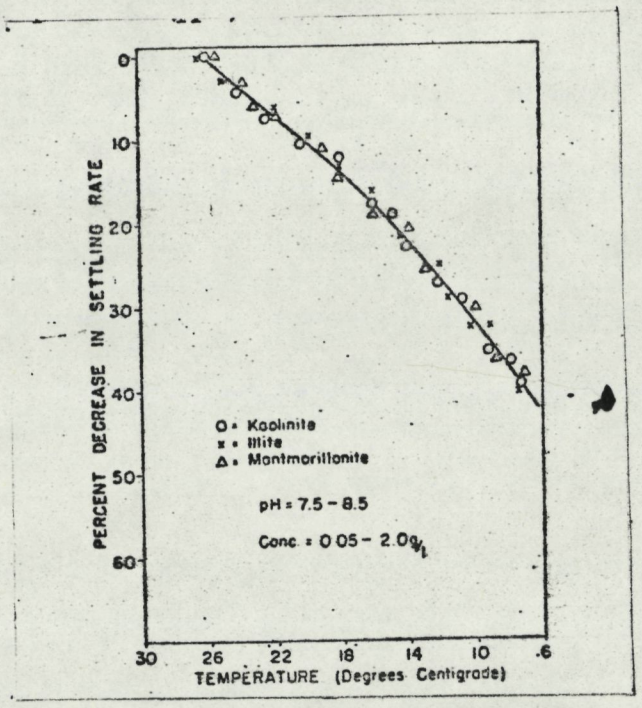


Fig. 1. De invloed van temperature verandering op de sedimentatie-snelheid van kleimineralen in rustig salien water (naar Whitehouse 1960). Sedimentatie-snelheid correleert met mate van flocculatie.

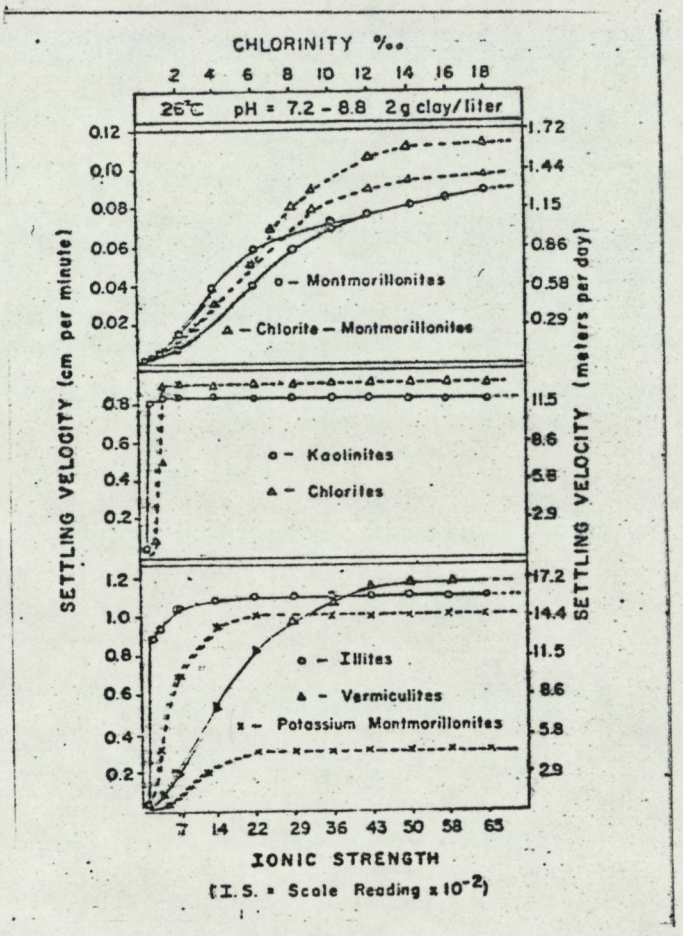


Fig. 2. Verschillen in de sedimentatie snelheden (en mate van flocculatie) van drie kleimineralen in kunstmatig zeewater (naar Whitehouse e.a., 1960).

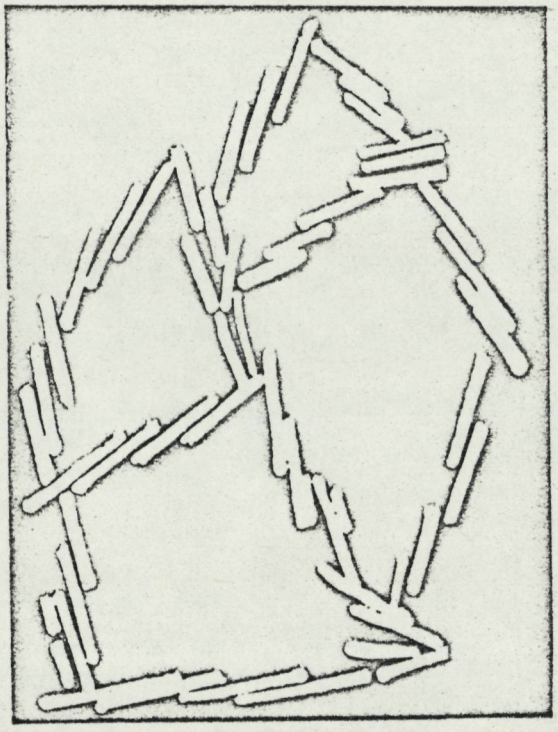


Fig.3. Schematische weergave van een uitgevlokt kaoliniet aggregaat. (O'Brien, 1971)

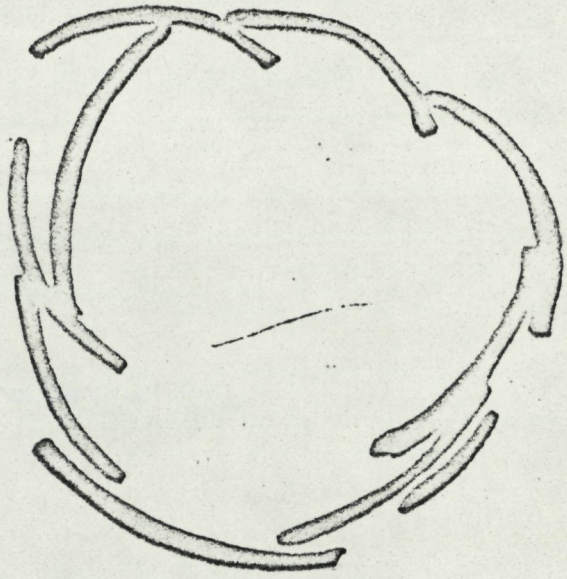


Fig. 4. Idem voor illiet. De bouw verschilt van die van kaoliniet door de gebogen vorm van de illiet plaatjes

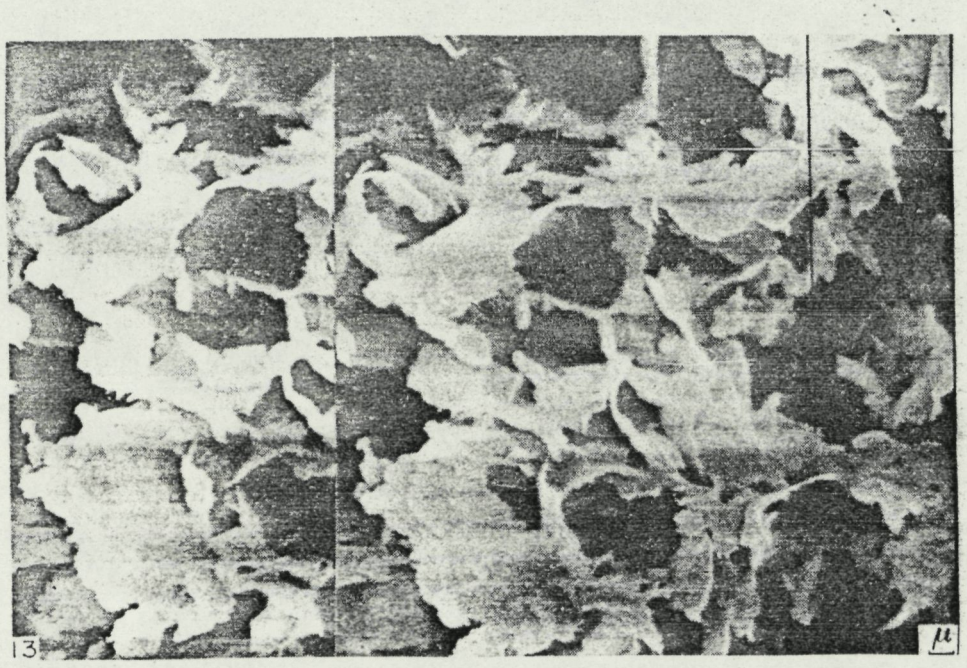


Fig. 5. Stereo fotos (Scanning Electron Microscope) van illiet aggregaatjes; de aggrgaatbouw werd intact gehouden d.m.v. vries-drogen. (concentratie illiet: 5gr./ liter)

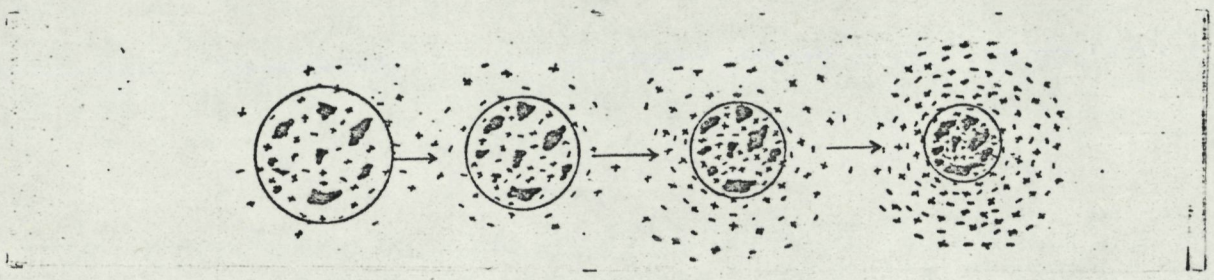


Fig. 6. Toename van eff. dichtheid van een kleiaggregaatje door toename van "ionic strength" van het medium (volgens Whitehouse e.a. 1960).

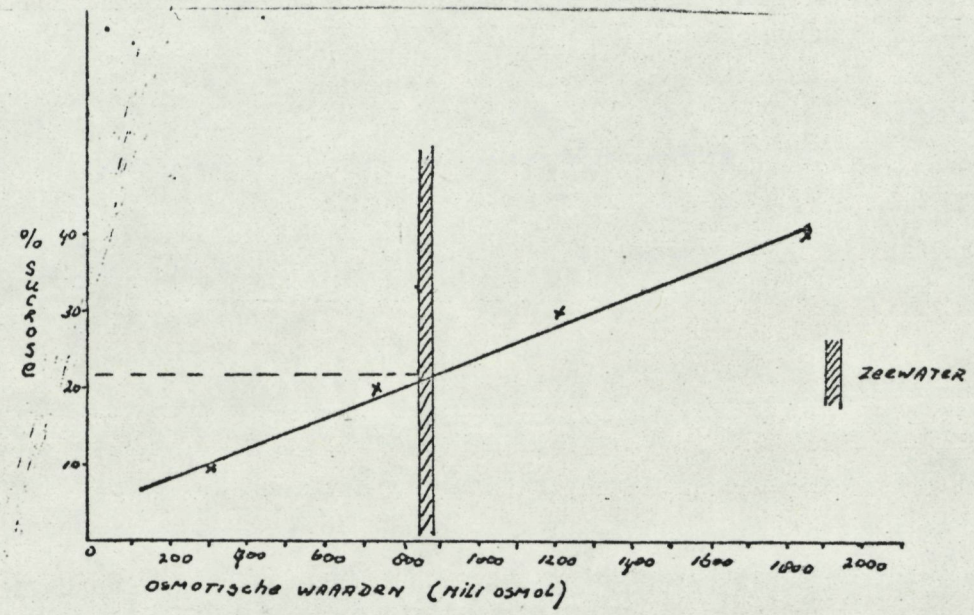


Fig. 7. Osmotische waarden van sucrose-oplossingen.

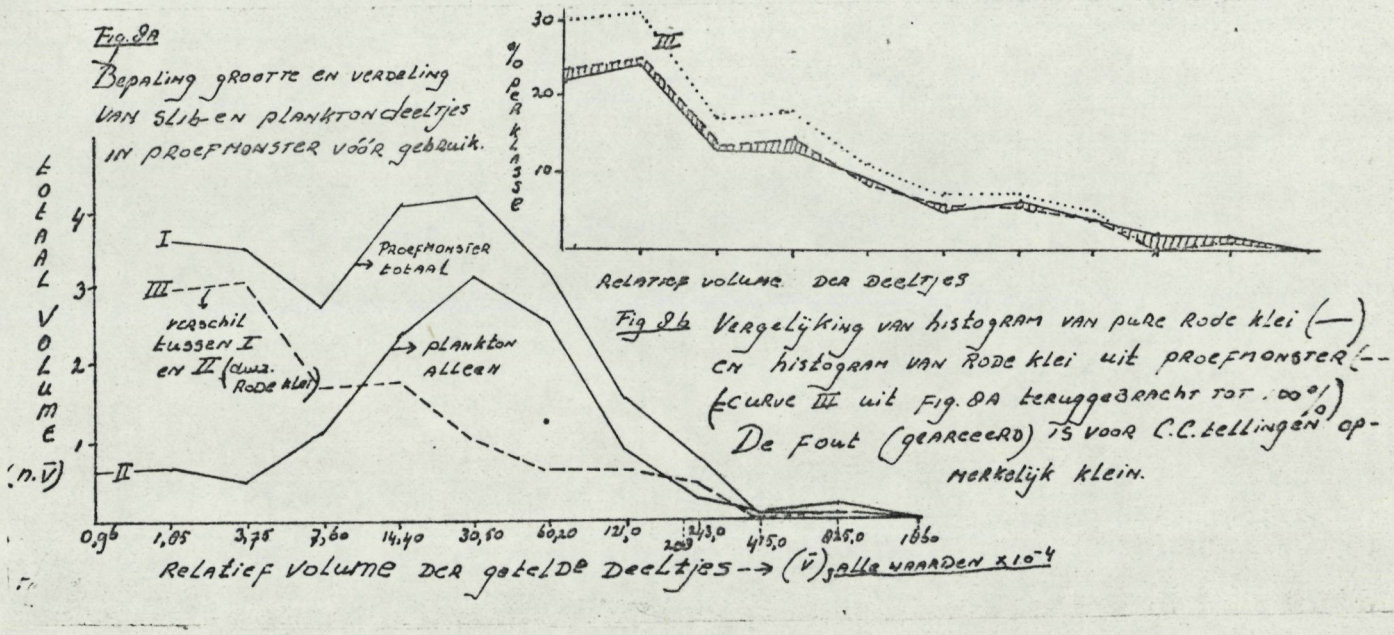

Fig. 8a
Bepaling grootte en verdeling van slib- en plankton deeltjes in proefmonster vóór gebruik.
TOTAAL VOLUME (n.v̄)
I
II
III
verschil tussen I en II (dus: Rode klei)
proefmonster totaal
plankton alleen
0,96 1,85 3,75 7,60 14,40 30,50 60,20 121,0 243,0 415,0 825,0 1660
Relatief volume der getelde deeltjes → (v̄) alle waarden x10⁻⁴
% per klasse
Relatief volume der deeltjes
Fig 8b Vergelijking van histogram van pure Rode klei (—) en histogram van Rode klei uit proefmonster (---- curve III uit Fig. 8A teruggebracht tot . 00 %)
De fout (gearceerd) is voor C.C. tellingen opmerkelijk klein.

Fig. 8.

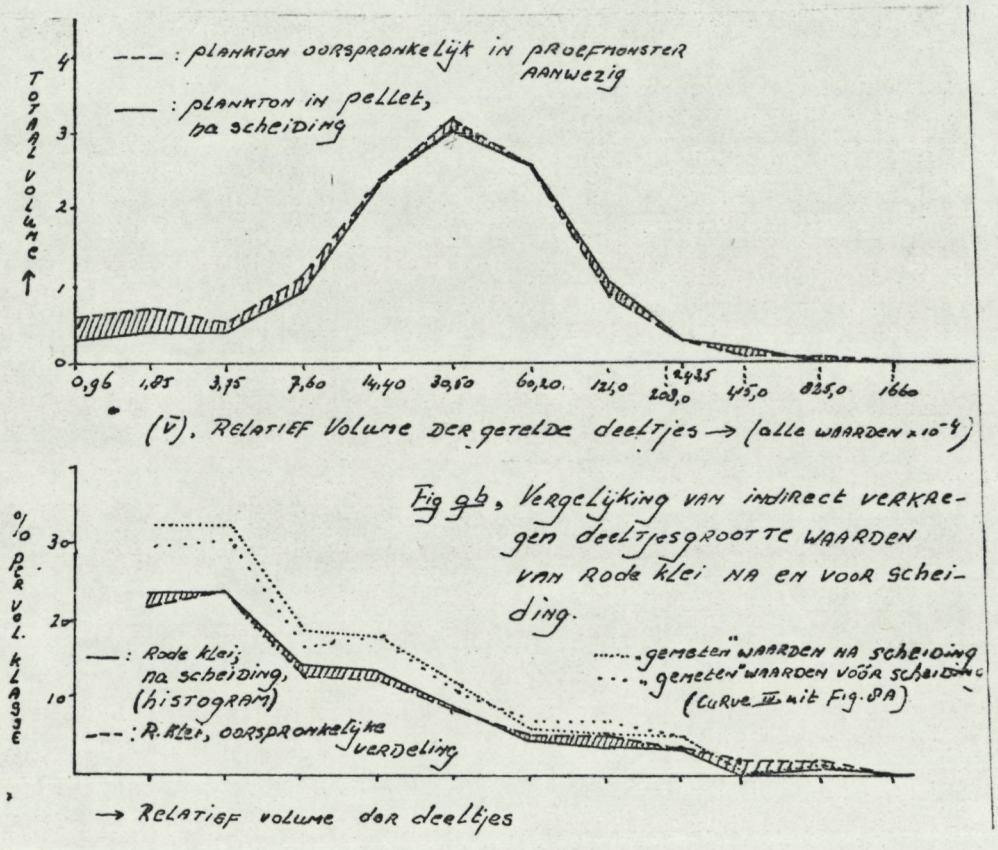

TOTAAL VOLUME
---: plankton oorspronkelijk in proefmonster aanwezig
——: plankton in pellet, na scheiding
0,96 1,85 3,75 7,60 14,40 30,50 60,20 121,0 243,0 415,0 825,0 1660
(v̄). Relatief Volume der getelde deeltjes → (alle waarden x10⁻⁴)
Fig 9b, Vergelijking van indirect verkregen deeltjesgrootte waarden van Rode klei na en voor scheiding.
% per vol. klasse
——: Rode klei, na scheiding, (histogram)
---: R. klei, oorspronkelijke verdeling
.....gemeten waarden na scheiding
... gemeten waarden voor scheiding (curve III uit Fig. 8A)
→ Relatief volume der deeltjes

Fig. 9.

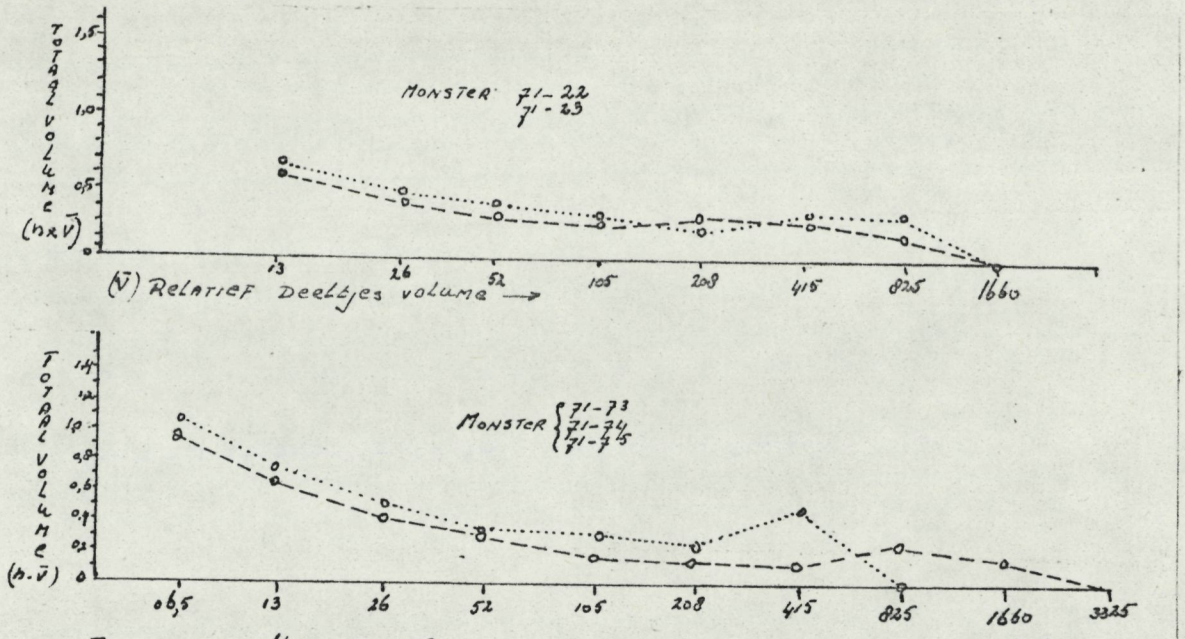


Fig 10. A & B Het effect (?) van staan op monsters zeewater uit de haven van het NIOZ. (——: Telresultaten direct na monstername; ····: idem na 24 u. staan op kamertemperatuur.)

Fig. 10.

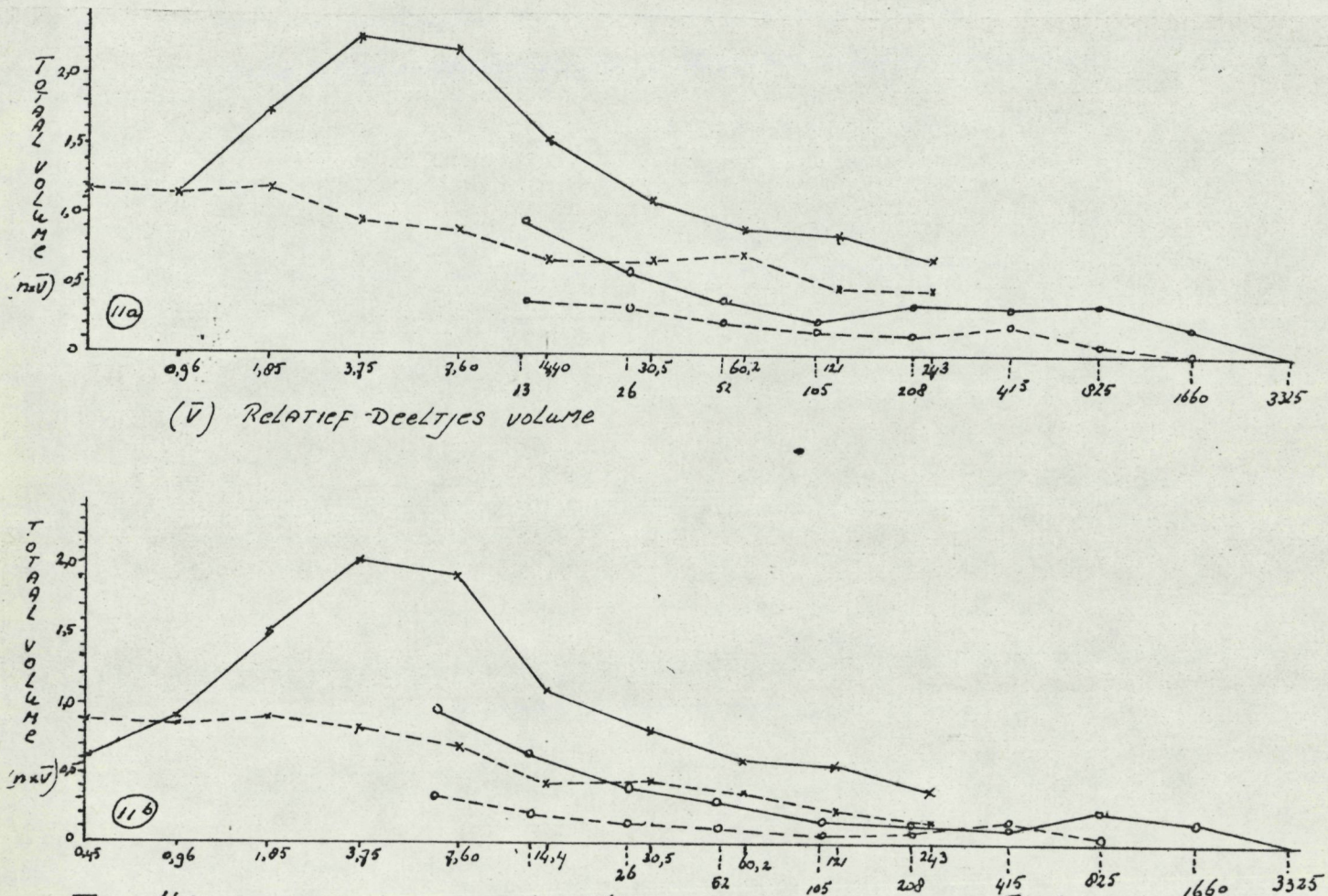


Fig 11 Het effect van ultrasoon-behandeling op natuurlijke monsters. Fig A geeft gemiddelde waarden van 4 „diep"water (4m) monsters uit het haventje van het NIOZ vóór (——) en ná (– – –) ultrasoon-behandeling. Fig B geeft hetzelfde voor 3 oppervlaktewater monsters van dezelfde plaats.

Fig. 11.

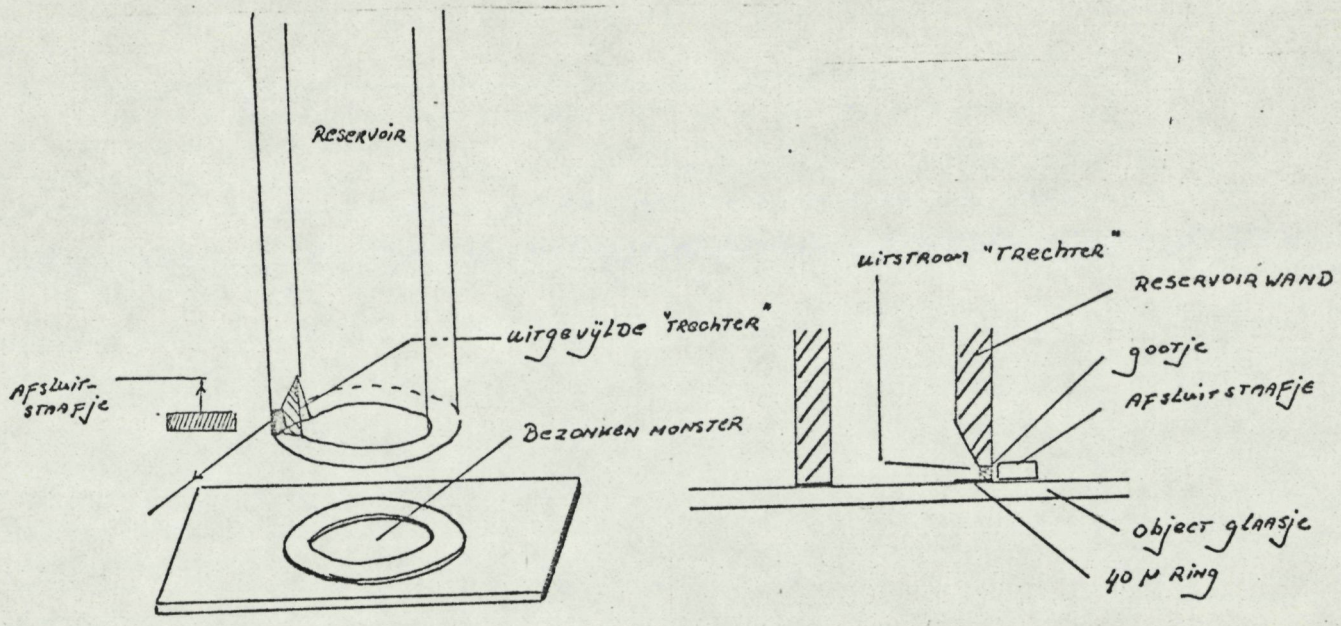

RESERVOIR
uitgevulde "TRECHTER"
AFSLUIT-STAAFJE
BEZONKEN MONSTER
UITSTROOM "TRECHTER"
RESERVOIR WAND
GOOTJE
AFSLUITSTAAFJE
object glaasje
40 µ RING

Fig. 12.