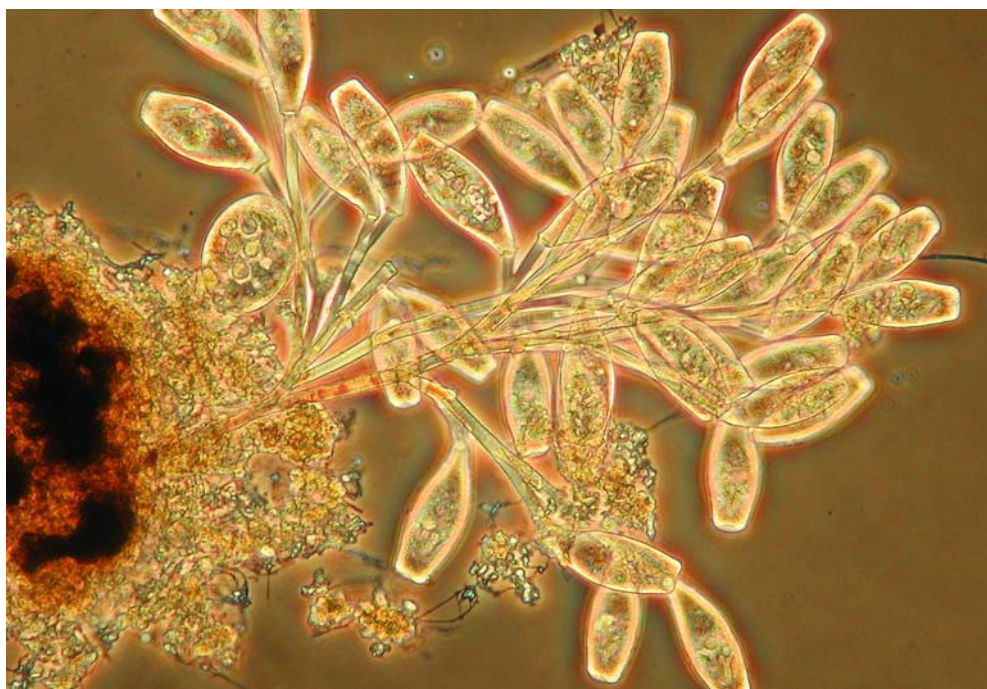


Strategier för effektiv nitrifikation – slamålderns betydelse

*Sara Hallin
Per-Eric Lindgren
Stefan Kokalj
Maria Rothman*



VA-Forsk

VA-Forsk är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna, vilket är unikt på så sätt att statliga medel tidigare alltid använts för denna typ av verksamhet. FoU-avgiften är för närvarande 1,05 kronor per kommuninnevånare och år. Avgiften är frivillig. Nästan alla kommuner är med i programmet, vilket innebär att budgeten årligen omfattar drygt åtta miljoner kronor.

VA-Forsk initierades gemensamt av Kommunförbundet och Svenskt Vatten. Verksamheten påbörjades år 1990. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området. Projekt bedrivs inom hela det VA-tekniska fältet under huvudrubrikerna:

Dricksvatten
Ledningsnät
Avloppsvattenrening
Ekonomi och organisation
Utbildning och information

VA-Forsk styrs av en kommitté, som utses av styrelsen för Svenskt Vatten AB. För närvarande har kommittén följande sammansättning:

Ola Burström, ordförande
Roger Bergström
Bengt Göran Hellström
Staffan Holmberg
Pär Jönsson
Peeter Maripuu
Stefan Marklund
Peter Stahre
Jan Söderström

Skellefteå
Svenskt Vatten AB
Stockholm Vatten AB
Haninge
Östersund
Vaxholm
Luleå
VA-verket Malmö
Sv kommunförbundet

Asle Aasen, adjungerad
Thomas Hellström, sekreterare

NORVAR, Norge
Svenskt Vatten AB

Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

VA-Forsk
Svenskt Vatten AB
Box 47607
117 94 Stockholm
Tfn 08-506 002 00
Fax 08-506 002 10
E-post svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se

Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Rapportens titel:	Strategier för effektiv nitrifikation – slamålderns betydelse
Title of the report:	Strategies for efficient nitrification – influence of sludge retention time
Rapportens beteckning Nr i VA-Forsk-serien:	2003-10
ISSN-nummer:	1102-5638
ISBN-nummer:	91-89182-74-X
Författare:	Sara Hallin, Sveriges lantbruksuniversitet, Per-Eric Lindgren, Linköpings universitet, Stefan Kokalj, Linköpings universitet, Maria Rothman, Sydkraft
VA-Forsk projekt nr:	20-117
Projektets namn:	Effektiv nitrifikation under vintern
Projektets finansiering:	VA-Forsk
Rapportens omfattning Sidantal:	36
Format:	A4
Upplaga:	800
Sökord:	Aktivslamprocess, filament, fosfor, kväverening, nitrifikation, slamålder, slamegenskaper
Keywords:	Activated sludge process, filamentous bacteria, nitrification, nitrogen removal, phosphorous, sludge age, sludge retention time
Sammandrag:	Syftet var att jämföra effekten av två driftstrategier med olika slamåldrar på de nitrifierande bakteriernas kapacitet och slamegenskaperna. Försöken bedrevs i två fullskaleblock vid Henriksdals reningsverk i 22 veckor. Det omsattes mer kväve per VSS i blocket med låg slamålder, men de olika driftstrategierna påverkade varken antalet eller sammansättningen av ammoniumoxiderare. Slamegenskaperna försämrades inte av hög slamålder. Filamenthalten var genomgående hög, vilket inte alltid korrelerade till dåliga sedimenteringsegenskaper. En låg slamålder bidrog till att mer fosfor frigjordes från slammet.
Abstract:	The aim was to compare the effect of two operational strategies with different sludge retention times (SRT) on the capacity of the nitrifying bacteria and the solids separation. Two separate full-scale trains were operated during 22 weeks at Henriksdal wastewater treatment plant. The nitrogen turn-over per VSS was higher in the low SRT system, but the number and composition of nitrifiers was not affected by the operational strategy. The solids separation was not affected by the SRT. The filament abundance was high in both trains but did not always correlate with poor solids separation. The phosphorous concentration in the return sludge was higher in the low SRT system.
Målgrupper:	Processchefer, VA-konsulter
Omslagsbild:	Slamflock med klockdjur, Foto Michael Médoc
Rapporten beställs från:	Svenskt Vattens distribution, Box 262, 591 23 Motala. Finns även att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2003
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB

Sammanfattning

För många reningsverk måste kvävereningen fungera året runt för att klara de hårda utsläppsvillkoren för kväve. Det ställer speciella krav på driften under vintern då nitrifikationen avtar och i värsta fall uteblir. Nitrifierande bakterier har en jämförelsevis låg tillväxthastighet, som minskar med sjunkande temperatur. Syftet med projektet var att jämföra två driftsstrategier där de nitrifierande bakteriernas kapacitet undersöktes samtidigt som eventuella negativa effekter på slamegenskaperna utvärderades. Alla studier på nitrifikation i projektet fokuserade på ammoniumoxidation, som är det första steget i nitrifikationen.

Försöken bedrevs i två fullskaleblock med olika driftstrategier vid Henriksdals reningsverk i Stockholm under 22 veckor våren 2001. Den samverkande effekten av slamålder och luftning på nitrifikationshastigheten, antalet nitrifierande bakterier och sammansättningen av den nitrifierande bakteriepopulationen undersöktes. Stora förändringar i artsammansättning eller antal kan förändra tillväxthastigheten av nitrifierande bakterier i aktivt slam. En sådan skillnad skulle ha effekt på styrning och optimering av processen. En annan viktig fråga var att undersöka driftsättens påverkan på slamegenskaperna och fosforläckaget från slammet i biosteget.

Både den potentiella och den aktuella nitrifikationshastigheten i bassängerna var högre i blocket med lägre slamålder och ökad luftning. Det omsattes alltså mer kväve per VSS i det blocket. Skillnaden i nitrifikationshastighet hade dock ingen effekt på kvävereningen, som var lika god i båda blocken. Antalet ammoniumoxiderare var relativt konstant (2×10^6 celler/ml) i de båda blocken under försöket och de olika driftsstrategierna påverkade inte antalet. Andelen ammoniumoxiderare var något högre i blocket med låg slamålder och aktiviteten per cell tenderade också att öka i det blocket under försökets sista fem veckor. De ammoniumoxiderande populationerna var lika i blocken, trots olika driftstrategier. Sammansättningen förändrades inte heller över tiden, vilket betyder att den är tämligen robust.

Skillnaden i slamegenskaper mellan försöksblocken var mindre än förväntat. Under första delen av försöket var slamvolymindex mellan 100 och 140 ml/g SS i båda blocken, men mot slutet hade det försämrats och var över 150 ml/g i båda blocken. Filamentförekomsten var stor under hela försöket med tendens till större förekomst i blocket med hög slamålder. Det fanns ett tydligt samband med filamentförekomst och dåliga slamegenskaper i blocket med låg slamålder, men inte i det med hög slamålder. Fosforhalten i returslammet varierade kraftigt och systemet med låg slamålder hade högre halter än det med hög slamålder. Antagandet att en högre slamålder skulle ge ett högre fosforläckage från slammet stämde alltså inte. Orsaken till de periodvis höga fosforhalterna i utgående vatten borde studeras närmare för att kunna optimera fosforeringen i efterföljande steg.

Val av driftstrategi handlar om det enskilda verkets förutsättningar och mål. En förutsättning för att kunna välja driftstrategi för effektiv nitrifikation är att förstå hur olika processer fungerar och eventuellt samverkar i en aktivslamprocess med kväverening. Det är viktigt att bygga upp en kunskapsbas över verket så att man vet inom vilket område driften är stabil och vet vilka de kritiska parametrarna är.

Summary

The effluent standards for larger wastewater treatment plants demand successful nitrogen removal throughout the whole year. However, nitrification during winter can be problematic due to the slow growth rate of nitrifying bacteria at low temperature. The aim with this project was to compare two operational strategies for efficient nitrification and at the same time evaluate eventual poor solids separation. For nitrification, the focus was on the first step; ammonia oxidation.

Two separate full-scale trains were operated with two different strategies during 22 weeks in spring 2001 at Henriksdal wastewater treatment plant in Stockholm. The concurrent effect of the sludge retention time (SRT) and the dissolved oxygen concentration on the nitrification rate and the numbers as well as the community composition of nitrifying bacteria were examined. Shifts in numbers or populations can alter the growth rate of the nitrifiers in activated sludge that in turn would affect control and optimization of the process. Another issue was to study the effect of the operational strategies on settling properties and phosphorous leakage from the sludge in the process.

Both the actual and potential ammonia-oxidation rates were higher in the process with a low SRT. Thus, the strategy resulted in a more biologically active sludge. The difference in nitrification rates did not affect the nitrogen removal efficiency, which was similar in the two trains. There was no difference between the two operational strategies regarding the numbers of ammonia-oxidizing bacteria and they were constant over time (2×10^6 cells/ml). The percentage of ammonia-oxidizers was higher in the low SRT system and data from the last five weeks indicated that this strategy could increase the specific activity of ammonia-oxidizing bacteria. There was no difference in the community composition either between the two operational strategies or during the time course.

The difference in poor solids separation between the two strategies was less than expected. During the first period of the experiment, the sludge volume index (SVI) was 100–140 ml/g SS in both trains. At the end, the SVI deteriorated and was higher than 150 ml/g. The filament abundance was high during the whole period but tended to be higher in train operated with a high SRT. The filament abundance correlated positively to the SVI in the low SRT system, but not in the other one. The phosphorous concentration in the return sludge varied but was higher in the low SRT system. The cause of the high effluent concentrations of phosphorous during periods should be ascertained to be able to optimize phosphorous removal down-streams in the plant.

The choice of operational strategies for efficient nitrification is a matter of balancing the conditions and goals of the individual treatment plant. A prerequisite to be able to make a valid choice is the knowledge of how different processes work and interact in an activated sludge process. It is important to evaluate the gathered experience and information of the treatment plant to form the basis of a stable operational strategy and to get a feeling for the critical parameters.

Förord

Projektet "Effektiv nitrifikation under vintern" utarbetades av *Maria Rothman*¹, tidigare processchef vid Henriksdals avloppsreningsverk, Stockholm Vatten AB, i Stockholm och mig själv. Idén till projektet föddes utifrån en diskussion vi hade ifall det gick att påverka den nitrifierande populationens effektivitet, det vill säga den specifika aktiviteten genom att se till att de alltid befann sig i exponentiell tillväxtfas. Att tänka i banor av optimering av slampopulationen ligger i linje med två artiklar³ som nyligen publicerades i tidskriften "Water Research" där forskare uppmanade mikrobiologer och ingenjörer att samarbeta med varandra för att öka kunskapen runt fundamentala frågor i aktivslamprocessen. Viktig kunskap att få fram är olika kvantitativa mått på mikroorganismer, såsom antal och kinetik, för att utveckla de matematiska modellerna så att de kan användas för optimering av slampopulationerna. Den mikrobiologiska forskningen har utvecklats tekniskt sett i och med alla nya molekylärbiologiska metoder som tagits fram och dessa metoder borde i högre utsträckning appliceras också på praktiska frågeställningar.

Syftet med vårt projekt var att undersöka den samverkande effekten av slamålder och syrehalt på de nitrifikationen i en aktivslamprocess. Vi ville hitta en driftsstrategi där bakteriernas kapacitet utnyttjades maximalt utan att slamegenskaperna försämrades. Försöken gjordes vid Henriksdals reningsverk under perioden januari till juni 2001. Många har varit inblandade och bidragit med olika kompetenser för att genomföra projektet:

Michael Médoc, Rolf Wolfe och *Johan Ståhl* vid Henriksdals reningsverk provtog under försöken. Michael tog också hand om alla analysvärden och beräknade data från processen. Rolf och Michael mikroskoperade slamprover och bestämde filamenthalten. Johan var den som bidrog till att vi också studerade fosforläckage från slammet i sedimenteringsbassängerna.

Anna Grotmaak ansvarade för alla analyser vid Stockholm Vatten AB.

*Maria Erikson, Annika Åberg*² och *Sara Hallin* vid Institutionen för mikrobiologi, SLU extraherade DNA från slamproverna och gjorde populationsstudierna.

Stefan Kokalj och *Per-Eric Lindgren* vid Institutionen för mätteknik, avdelningen för mikrobiologi, Linköpings universitet bestämde antalet ammoniumoxiderande bakterier med en metod som utvecklades av en tidigare doktorand, Anna Hermansson, i gruppen. De mätte också mängden extraherat DNA i alla slamprov.

Projektet har finansierats av VA-Forsk och Stockholm Vatten AB.

Uppsala, juli 2002

Sara Hallin, projektledare

1) Numera vid Sydkraft i Norrköping

2) Numera doktorand vid Tekniska högskolan i Luleå

3) Yuan Z. & Blackall LL. 2002. *Water Research* 36, 482–490; Cronje GL, Beecharry AO, Wentzel MC & Ekama GA. 2002. *Water Research* 36, 439–444.

Innehåll

Bibliografiska uppgifter

Sammanfattning

Summary

Förord

Inledning	1
Problembeskrivning	1
Målsättning	1
Bakgrund.....	3
Henriksdals avloppsreningsverk	3
Nitrifikation	3
Material och metoder	5
Försöksblocken, försöksuppställning och provtagning	5
Potentiell nitrifikationshastighet.....	6
Populationsstudier av ammoniumoxiderande bakterier	6
<i>DNA extraktion</i>	<i>6</i>
<i>Detektion av DNA med PCR</i>	<i>7</i>
<i>Denaturerande gradientgel elektrofores (DGGE)</i>	<i>7</i>
<i>Kvantifiering av nitrifierande bakterier med realtids-PCR</i>	<i>8</i>
Slamegenskaper	8
<i>Slamvolym och slamvolymindex.....</i>	<i>8</i>
<i>Mikroskopisk karaktärisering av filamenthalt</i>	<i>8</i>
<i>Potential för fosforläckage</i>	<i>9</i>
Kemiska analyser	9
Resultat	10
Drift och reningsresultat	10
Nitrifikationsstudier	11
Slamegenskaper	14
Fosfor	15
Diskussion	16
Faktorer som styr nitrifikationen.....	16
Populationsstudier av ammoniumoxiderande bakterier	17
<i>De ammoniumoxiderande populationerna bestod över tiden</i>	<i>17</i>
<i>Antalet ammoniumoxiderande bakterier förändrades inte</i>	<i>18</i>
<i>Andelen ammoniumoxiderare av bakterierna i slammet.....</i>	<i>20</i>
Lägre slamålder kan ge effektivare nitrifikation	20
<i>Nitrifikationshastighet per cell.....</i>	<i>21</i>
Sedimenteringsegenskaperna opåverkade av slamåldern	21
<i>Höga halter av filament trots acceptabelt SVI</i>	<i>21</i>
Ibland läckte slammet fosfor	23
Den praktiska betydelsen för reningsverken	23
<i>Nitrifierarnas antal och sammansättning</i>	<i>24</i>
<i>Filamentbildare och slamsvällning.....</i>	<i>24</i>
<i>Fosfor och kemisk fällning.....</i>	<i>24</i>
<i>Ekonomi</i>	<i>25</i>
<i>Varför var det inte så stor skillnad?</i>	<i>25</i>
Slutsatser	26
Referenser.....	27

Inledning

Problembeskrivning

Successivt höjda krav på avloppsvattenrening kräver effektiva reningsverk. Avloppsreningsverk större än 100 000 person ekvivalenter (p. e.) och med utsläpp i havs- eller kustvattenområden har årsmedelvärde 10 mg N/l eller lägre som riktvärde för utsläpp av totalkväve alternativt 70 % som minsta procentuella reduktion (SNFS 1998:7). Det senare alternativet gäller även för avloppsreningsverk med 10 000 – 100 000 p. e. anslutna, medan riktvärdet för högsta tillåtna koncentration av totalkväve är 15 mgN/l.

De hårdare utsläppsvillkoren på kvävesidan fordrar idag att kvävereningen fungerar året runt, vilket ställer speciella krav på driften under vintern då nitrifikationen avtar och i värsta fall uteblir. Nitrifierande bakterier har en jämförelsevis låg tillväxthastighet, som minskar med sjunkande temperatur. Varje reningsverk har en så kallad kritisk slamålder, det vill säga den slamålder som krävs för att nitrifierarnas tillväxt skall vara lika stor som uttaget av överskottslam. Ett effektivt reningsverk behöver en stabil driftsstrategi för kvävereningsprocessen som inte innebär att inaktivt slam pumpas runt i anläggningen eller försämrar sedimenteringen.

Det som vanligtvis görs för att behålla nitrifierarna i en aktivslamprocess är att öka slamåldern för att kunna hålla utgående ammoniumhalt nära noll. Slamåldern väljs gärna med god marginal över den kritiska slamåldern. En nackdel med att förlänga uppehållstiden är att en stor andel inert slam ofta pumpas runt i systemet. Sekundära effekter av detta kan vara dåliga slamegenskaper och höga halter av löst fosfor orsakade av frigörelse av fosfor från slammet. De dåliga slamegenskaperna beror ofta på trådformiga bakterier, speciellt "*Microthrix parvicella*". Detta är ett stort problem för många verk med kväverening.

Ett annat sätt är att hålla slamåldern så nära den kritiska slamåldern som möjligt och tillåta ett visst ammoniumläckage från processen. För att gynna denna strategi används periodvis höga syrehalter. Idén här är att undvika att de nitrifierande bakterierna utsätts för ammonium- och syrebrist. De är då i en aktiv tillväxtfas och nitrifierar mer effektivt. Kvävereningsprocessen kan bli mer instabil och kräva en mer aktiv övervakning, men slamegenskaperna kan bli bättre.

Målsättning

Syftet med projektet var att jämföra två driftsstrategier där de nitrifierande bakteriernas kapacitet undersöktes samtidigt som eventuella negativa effekter på slamegenskaperna och fosforeringen utvärderades. Vi har undersökt betydelse av slamålder för nitrifikationspotentialen i aktivt slam. I begreppet potential har ingått nitrifikationshastighet, antal nitrifierande bakterier och därmed också hastigheten per cell. Genom att samtidigt mäta potentiella och faktiska hastigheter av nitrifikation undersöktes anläggningens kapacitet och effektivitet.

En annan viktig fråga att belysa var ifall sammansättningen på den nitrifierande bakteriepopulationen påverkades av slamåldern. Förändringar i sammansättning skulle

kunna påverka populationens tillväxthastighet. En sådan skillnad har direkt effekt på styrning och optimering av processen med till exempel slamålder. Samma resonemang kan gälla om den ursprungliga populationen består, men att de enskilda cellerna förändrar nitrifikationsaktiviteten.

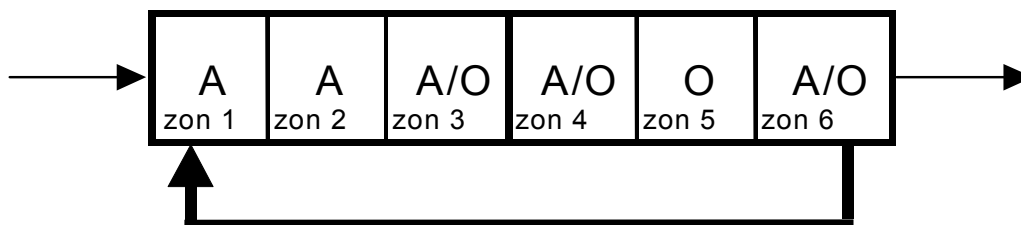
Alla studier på nitrifikation i projektet fokuserade på ammoniumoxidation, som är det första steget i nitrifikationen. Anledning är dels att det anses som det hastighetsbegränsande steget och dels att det ofta är det som är känsligast för störningar (Blackall och Burrell, 1999).

Bakgrund

Henriksdals avloppsreningsverk

Henriksdals avloppsreningsverk är dimensionerat för 640 000 p. e. och 330 000 m³ vatten innehållande maximalt 45 ton BOD₇ och 12 ton totalkväve per dygn. Vattnet renas genom mekanisk, kemisk och biologisk rening i en aktivslamprocess samt filtrering. Slammet rötas och avvattnas sedan i centrifuger. Reningskraven är flödesproportionellt sammanvägda värden från tre reningsverk i Stockholm med gemensam utsläppspunkt. Gränsvärden, som baseras på kvartalsmedelvärden, är 0,3 mg/l för totalfosfor och 8 mg/l för BOD₇. Det finns två olika kvävekrav; kravet för totalkväve är ett riktvärde på 10 mg/l och gäller som årsmedelvärde medan ammoniumkravet är på 3 mg NH₄-N/l som medelvärde under perioden juli till oktober.

Den kemiska reningen sker med tvåpunktsdosering av järnsulfat, dels som förfällning med en dos mellan 10 och 18 g Fe/m³ och dels som fällning över filtren med 1 till 4 g Fe/m³. Anläggningen har aktivslamprocess med fördenitrifikation och det biologiska reningssteget består av sju parallella linjer, så kallade block. Varje block fungerar som en separat anläggning. Ett block består av två seriekopplade luftningsbassänger och två parallellkopplade sedimenteringsbassänger med den totala arean 1 600 m². Luftningsbassängerna har volymen 29 000 m³ per block och är 12 m djupa. Varje par av luftningsbassänger är uppdelade i sex zoner, av vilka zon 3–6 kan luftas (Fig. 1). Det finns inga mellanväggar mellan zonerna, förutom mellan zon 3 och 4, eftersom de ligger i olika bassänger. Vattnet recirkuleras från zon 6 till zon 1.



Figur 1. Utformning av biosteget samt olika processmöjligheter för respektive zon (A: Anoxisk zon, O: Luftad zon).

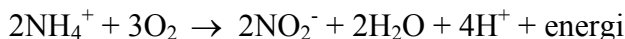
Nitrifikation

Nitrifierande bakterier finns överallt i mark och vatten, men sällan i så stora antal som heterotrofa bakterier, det vill säga bakterier som använder en organisk kolkälla. De gynnas av miljöer med höga ammoniumhalter och neutralt pH, t ex avloppsreningsverk eller gödslad åkermark. Förmågan att nitrifiera är högt specialiserad och finns bara hos några få grupper av bakterier. Nitrifierande bakterier är specialiserade på att utvinna energi från ammonium eller nitrit, till skillnad från de flesta andra bakterier som får sin energi från organiska föreningar. De flesta nitrifierande bakterier är aeroba och andas med syre för att oxidera ammonium eller nitrit. Vid för låga syrehalter hämmas aktiviteten, men det finns flera nitrifierare som kan tillväxa även vid låga syrehalter

(Blackall och Burell, 1999). Nitrifikation är en summa av två processer som sker i följd och utförs av två olika grupper av bakterier:

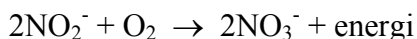
1. Ammoniumoxiderande bakterier oxiderar ammonium till nitrit:

ammonium + syre $\rightarrow$ nitrit + vatten + vätejoner + energi



2. Nitritoxiderande bakterier oxiderar nitrit till nitrat:

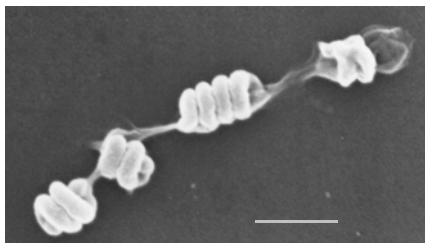
nitrit + syre $\rightarrow$ nitrat + energi



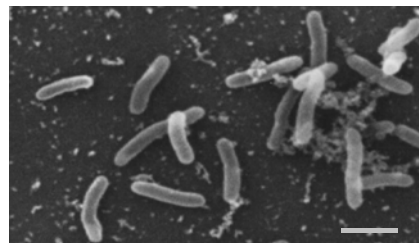
En stor del av den utvunna energin använder nitrifierarna för att fixera koldioxid från luften och utnyttja denna till att bygga upp cellen. De är därmed autotrofer och lever helt på oorganiskt material. Det finns även nitrifierande bakterier som är heterotrofer och använder organiska kolkällor. Dessa återfinns särskilt bland de nitritoxiderande bakterierna. Aktivt slam domineras av autotrofa nitrifierare både av de ammonium- och nitritoxiderande bakterierna. Det åtgår mycket energi för att fixera koldioxid och hela 80 % av energibudgeten går åt till denna process (Wood, 1986). Nitrifierande bakterier måste därför oxidera stora mängder ammonium respektive nitrit för att kunna tillväxa och endast 2–10 % av den fria energin används för tillväxt. Det gör att de växer långsamt med en generationstid på 8–60 timmar, vilket kan jämföras med *E. coli* som har en generationstid på ca 20–30 minuter under optimala förhållanden.

Klassificeringen av nitrifierande bakterier baserade sig länge på hur bakterierna ser ut i mikroskop, vilket också avspeglas i släktenas namn. De autotrofa ammoniumoxiderarna finns inom släktena *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* och *Nitrosolobus* medan nitritoxiderarna delas in i släktena *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* och *Nitrococcus*. Under senare år har omklassificeringar diskuterats och de baseras till stor del på molekylärbiologiska studier av ribosomala RNA gener som används för släktskapsbestämning. Speciellt de autotrofa nitrifierarna är svåra att isolera från sin miljö och flera stammar går till och med inte att odla i renkultur på laboratorium. Detta gör att den enda framkomliga vägen i många fall är att studera dem med molekylärbiologisk teknik, som inte baserar sig på odling.

a)



b)



Figur 2. Ammoniumoxiderande bakterier fotograferade med svepelektronmikroskop: a) *Nitrospira* sp. och b) *Nitrosomonas* sp. Skalstrecken motsvarar 1 μm . (Foto: Ågot Aakra)

Material och metoder

Försöksblocken, försöksupställning och provtagning

Försöket utfördes i Block 2 och 3 (B2 och B3) av de totalt sju blocken i det biologiska reningssteget på Henriksdals reningsverk. Medelflödet av inkommande vatten var $0,42 \text{ m}^3/\text{s}$ med ett maxflöde av $1,1$. Recirkulering av processvatten från zon 6 till de anoxiska zonerna 1–3 (Fig. 1) skedde med ett konstant flöde av $1,8 \text{ m}^3/\text{s}$, vilket motsvarar en intern recirkulationsgrad av drygt 4. Temperaturen ökade under försöksperioden från 10 till 17°C . Den största temperaturökningen var under försökets två sista månader då temperaturen ökade från 13 till 17°C . Övriga karaktäristika för inkommande vatten finns redovisat i Tabell 1.

Tabell 1. Inkommande vatten under försöksperioden

Parameter	Medelvärde $\pm$ SD* (mg/l)
Tot-N	$33 \pm 3,8$
NH ₄ -N	$26 \pm 3,1$
Tot-P	$3,8 \pm 0,5$
COD	210 ± 19

*) Standardavvikelse, $n=152$

Försöksblocken drevs under år 2001 enligt två olika strategier under 22 veckor från vecka 5 till vecka 26 (Tab. 2). Den strategi som tillämpades i Block 3 är den som Henriksdal normalt använder i alla luftningsbassänger. Under försöket var zonerna 4 och 5 alltid luftade medan zon 6 luftades under två perioder i båda blocken beroende på utgående ammoniumhalt. Med on-line mätare mättes kontinuerligt syrehalterna i zon 4 – 6 (Danfoss), slamhalt i biosteget (Cerlic) samt utgående ammonium (Contronic). Provtagning skedde som stickprov på slamfasen i slutet av luftningsbassängen samt i returslammet och som dygnsprov in och ut från blocken. Stickproven togs ut en gång per vecka medan dygnsprov togs ut under vardagar samt som ett samlingsprov under helgerna. Under de sista 5 veckorna togs stickproven endast ut varannan vecka.

Tabell 2. Driftstrategi för försöksblocken

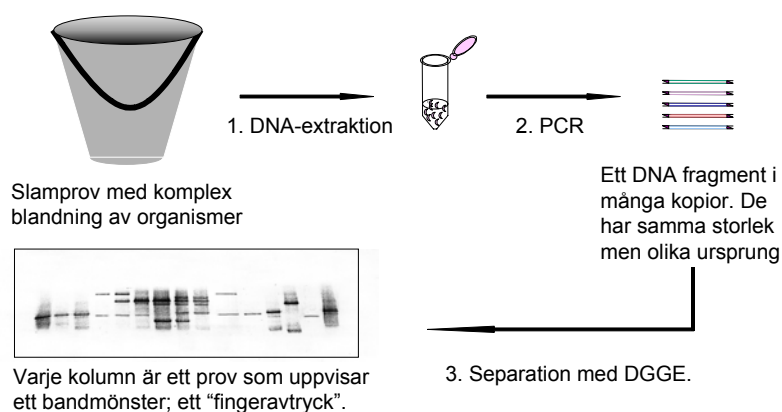
Block	Driftstrategi
B2	Hög slamålder genom en slamhalt på ca $3\,500 \text{ mg/l}$, syrehalt 2 mg/l och utgående NH ₄ -N mindre än 1 mg/l .
B3	Lägre slamålder genom en slamhalt på ca $2\,500 \text{ mg/l}$, syrehalt $2\text{--}4 \text{ mg/l}$ och utgående NH ₄ -N mellan $1\text{--}3 \text{ mg/l}$.

Potentiell nitrifikationshastighet

Den potentiella nitrifikationshastigheten bestämdes med tre upprepningar för varje prov enligt den metod som används vid Vandkvalitetsinstitutet i Danmark (Avprövning av screeningmetoder för nitrifikationshämning, 1993). Metoden bygger på att syre och $\text{NH}_4^+\text{-N}$ finns i överskott varmed potentialen för nitrifikationshastigheten bestäms genom att analysera produktionen av NO_3^-N vid 20°C (Tab. 3).

Populationsstudier av ammoniumoxiderande bakterier

Sammansättningen av de ammoniumoxiderande populationerna i respektive försöksblock undersöktes med molekylärbiologiska metoder, vilka bygger på att DNA från alla organismer i slammet extraheras och renas. DNA-fragment från ammoniumoxiderande bakterier i proverna uppförökas därefter specifikt med "polymerase chain reaction" (PCR). Dessa DNA-fragment undersöks sedan med avseende på sekvensen med en så kallad fingeravtrycksmetod (se "Denaturerande gradientgel elektrofores [DGGE] nedan), vilken ger ett kvalitativt uttryck på bakterieförekomst och mångfald i proverna. En generell beskrivning av konceptet redovisas i Figur 3. För kvantifiering av ammoniumoxiderande bakterier användes en annan, liknande metod för uppförökning av DNA (se "Kvantifiering av nitrifierande bakterier med realtids-PCR", nedan).



Figur 3. Koncept för DNA-baserade populationsstudier analyserade med DGGE.

DNA extraktion

DNA extraherades från vartannat stickprov under försökets första åtta veckor och sedan från samtliga stickprover med tre upprepningar av varje prov. För extraktion användes en färdig sats (FastDNA Spin kit for Soil, Bio101, Qbiogene, Kanada) med principen att först mekaniskt slå sönder alla celler med små glaskulor och sedan rena det frisatta DNA:t med en affinitetskolumn.

Vid provtagning i försöksblocken togs 100 ml aktivt slam från respektive block och fördelades i 10 rör. Slammet centrifugerades vid 6 000 rpm i 10 minuter. Supernatanten

hålldes av och slampelletten förvarades vid -20°C. Ett rör per stickprov delades upp i tre delar och DNA extraherades enligt tillverkarens protokoll. Från respektive extraktion löstes DNA:t upp i 100 µl sterilt pyrogenfritt vatten.

Mängden DNA efter extraktionen bestämdes fluorimetriskt med hjälp av ett färgämne, PicoGreen (Molecular Probes, USA), som fluorescerar vid bindning till dubbelsträngat DNA. Koncentrationsbestämningen utfördes i huvudsak enligt anvisningar från tillverkaren. Fluorescensen mättes med en fluorospektrometer (FLUOstar, BMG LabTechnologies) på de spädda DNA-extrakten och på standardprover med kända DNA-koncentrationer i en mikrotiterplatta.

Detektion av DNA med PCR

Vid PCR kopieras först det DNA som finns i provet och sedan kopieras kopian och det ursprungliga DNA:t och så vidare i 30–35 omgångar, vilket ger en fördubbling av DNA-mängden i varje omgång. Stora kvantiteter DNA kan då fås från ursprungligen små mängder, vilket underlättar analysen. Vilket DNA som skall kopieras väljs utifrån de startmolekyler (primrar) som initierar kopieringen. För att hitta ammoniumoxiderarna användes en del av en av de ribosomala RNA generna (16S rRNA) som målmolekyl. Denna gens uppbyggnad är korrelerad till släktskap hos organismer.

Efter extraktion av DNA från aktivt slam uppförökades DNA från ammoniumoxiderande bakterier med PCR ("polymerase chain reaktion") i två steg. Först amplifierades ett längre fragment av 16S rRNA genen med generella primrar, som binder till DNA från alla bakterier. Därefter amplifierades ett kortare DNA-fragment (465 baspar) lokaliserat inom det större fragmentet med specifika primrar för ammoniumoxiderare (Kowalchuk m fl, 1997).

DNA extrakten späddes 100 gånger och 2 µl sattes till 23 µl av en PCR-mix med 1 µM generella primrar, 0,2 µM nukleotider och 0,05 U enzym (Taq-polymeras; Pharmacia Biotech) för att utföra kopieringen. Uppförökningen av DNA skedde i en PCR-maskin (Minicycler; MJ Res. Inc.) där proverna först värmdes till 94°C och därefter bestod varje cykel av 30 s vid 94°C, 30 s vid 45°C, 1 min vid 72°C. Efter 30 cykler avslutades uppförökningen med 10 min vid 72°C. Till följande PCR späddes provet 50 gånger och 2 µl sattes till 23 µl av en ny PCR-mix innehållande specifika primrar för ammoniumoxiderande bakterier och nukleotider och Taq-polymeras enligt ovan. Det specifika DNA:t kopierades i 35 cykler (2³⁵) enligt ovan, men med 57°C istället för 45°C, och förvarades sedan vid -20°C.

Denaturerande gradientgel elektrofores (DGGE)

Karaktärisering av de ammoniumoxiderande populationer gjordes genom att kvalitativt bestämma genetisk diversitet i slamprover med DGGE, som är en så kallad fingeravtrycksmetod. Med DGGE kan man analysera de identiskt lika långa DNA-fragment, som amplifierats med PCR genom att separera dem i en denaturerande gel. Beroende på fragmentens sammansättning kommer de att denaturera, det vill säga det dubbelsträngade DNA:t går isär och blir delvis enkelsträngat, olika snabbt vilket betyder att de bromsas upp på olika nivåer i gelén under elektrofores. De bandmönster som uppstår blir ett fingeravtryck av sammansättningen av bakterier i respektive prov.

PCR-fragmenten som erhållits med de specifika primrarna för ammoniumoxiderare (Kowalchuk m fl, 1997) separerades i polyakrylamidgeler bestående av 7 % polyakrylamid och TAE (40 mM Tris; 20 mM natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,5) med 30–60 % denaturant. Definitionen för 100 % denaturant var 7 M urea och 40 % (v/v) formamid (Muyzer m fl, 1993). Gradienten i gelerna erhöles med 475 Gradient Delivery System (BIO-RAD). Elektroforesen kördes vid 130 V under 13 h vid 60°C med DGGE-utrustning från BIO-RAD. DNA fragmenten färgades med etidiumbromid och belystes med UV-ljus för fotografering.

Kvantifiering av nitrifierande bakterier med realtids-PCR

Ammoniumoxiderande bakterier kvantifierades med en PCR-baserad metod där uppförökningen av DNA detekteras samtidigt som den sker (i realtid). För detta ändamål användes det så kallade TaqMan systemet (Heid m fl, 1996) som baseras på att en fluorescerande moleky (sond) först fäster vid mål-DNA:t och sedan klyvs bort från detta när det amplifieras, varvid ljus avges. Sonden kan bara fästa på det DNA som den är skapad för och den avgivna ljusmängden blir därför ett mått på hur mycket DNA av en viss sort det finns i provet vid start. Primrarna och den fluorescerande sonden som användes kan bara föröka upp DNA från ammoniumoxiderande bakterier och är därmed specifika för denna grupp (Hermansson och Lindgren, 2001).

Real-tids PCR utfördes enligt Hermansson och Lindgren (2001). Uppförökningen av DNA specifikt från ammoniumoxiderare analyserades i en PCR maskin som mäter fluorescensen i PCR reaktionen (ABI prism SDS 7000; PE Applied Biosystems). Fluorescensdata analyserades med hjälp av dataprogrammet PrimerExpress (PE Applied Biosystems) och antalet genom från ammoniumoxiderare per ml räknades ut från en standardkurva bestående av DNA från en renkultur av *Nitrosomonas europaea*. Antalet bakterieceller kan därefter beräknas utifrån kännedom om genomstorleken och antagandena att varje genom innehåller en kopia av 16S rRNA genen och att varje cell innehåller i genomsnitt 1,3 genom/cell.

Slamegenskaper

Slamvolym och slamvolymindex

Slamvolymen (SV) bestämdes genom att 1000 ml slam blandades med 1000 ml kranvatten. Vatten- och slamfasen blandades i en 5 l dunk genom skakning under 30 sekunder för att undvika flotation vid mätning. Därefter hölls blandningen upp i en 1000 ml mätglas med 78 mm diameter för att sedimentera. Slamvolymen lästes av efter 30 minuter. Slamvolymindex (SVI) beräknades som kvoten av slamvolymen och slamhalten (SS) i provet. Testet motsvarar spädd slamvolymindex (DSVI).

Mikroskopisk karaktärisering av filamenthalt

Filamenthalten bestämdes genom mikroskopering i faskontrastmikroskop (Nikon Optihot-2) i 100 och 400 gångers förstoring enligt det förenklade schema för filamentförekomst som Jenkins m fl (1993) utvecklade. Filamenthalten bestämdes både som total filamenthalt och halten filament som sticker ut från flokken i en sex-gradig skala där 1 är lägsta filamenthalten.

Potential för fosforläckage

Slammets potential för fosforläckage bestämdes i alla stickprover genom att 1,5 l slam från slutet av luftningsbassängen fick stå med omrörning i en 2 l bägare med tillsats av 0,5 ml ättiksyra. Prov togs ut vid start och efter 8 timmar och filtrerades med veckfilter och med milliporfiltrering i GFA-filter. Fosforhalten bestämdes därefter som totalfosfor i det filtrerade provet enligt tabell 3. Potentialen för fosforläckage definierades som skillnaden mellan start- och sluthalt. Förloppet studerades dessutom vid tre tillfällen (vecka 6, 13 och 20) i prov från respektive försöksblock genom att fosforhalten bestämdes efter 0, 20, 40 och 60 min och sedan varje timme under 8 timmar.

Kemiska analyser

Samtliga kemiska analyser utfördes vid Stockholm Vatten AB:s laboratorium (Tab. 3).

Tabell 3. Metoder för kemiska analyser

Parameter	Analysmetod	Noggrannhet (%)
Ammonium, NH ₄ -N	Kjeltec-titrering. AN 300	4 % vid 12,5 mg/l 20 % vid 1 mg/l
Nitrat, NO ₃ -N	Summan nitrit+nitrat. FIA-metod. SS EN ISO 13395/ASN 143-02/90	12 % vid 1 mg/l 5 % vid 15 mg/l
Fosfor, PO ₄ -P	Spektrofotometrisk metod. SS 028126-2	5 % vid 0,25 mg/l
Fosfor, tot-P	Uppslutning med kaliumperoxodisulfat. Spektrofotometrisk metod, 0,01–1,0 mg/l. SS 028127-2	5 % vid 0,30 mg/l
Fosfor, tot-P	Uppslutning med kaliumperoxodisulfat. FIA, 1,0–12,5 mg/l. ASN 5470	5 % vid 0,9 och 9 mg/l
Fosfor, tot-P	Uppslutning med salpetersyra. ICP. SM 4500-P B:4 och SS028126-2	10 % vid 1,7 % av TS
COD _{Cr}	Uppslutning med kaliumdikromat och syra. Spektrofotometrisk metod. SS 028142-2 mod	4 % vid 500 mg/l 10 % vid 25 mg/l
Fria syror, VFA	Bindning till etylenglykol. Reagens: FeCl ₃ och hydroxylammoniumamin. Spektrofotometrisk metod. Enligt VAV:s metod.	4 % vid 200 mg/l 15 % vid 50 mg/l
Suspenderad substans, SS	Filtrering genom MGA-filter. SS 028112-3	10 % vid analys av ink. Avl 30 % vid analys av utg. avl 5 % vid analys av slam
Glödförlust, GF (VSS)	Glödning 2h i 550°C. SS EN ISO 872-1	10 % vid analys av ink. avl 30 % vid analys av utg. avl 5 % vid analys av slam
pH	Gelelektrod. SS-EN 12 176	2 % vid pH 9

Resultat

Drift och reningsresultat

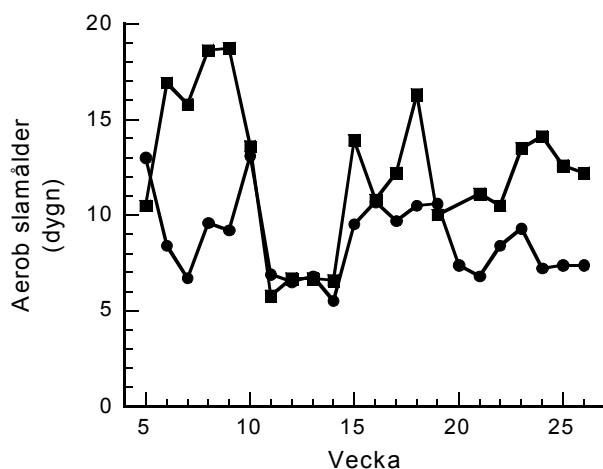
Försöket pågick under 152 dagar mellan vecka 5 och 26. I tabell 4 är olika driftparametrar och reningsresultat för de två försöksblocken sammanställda. Blocken fungerade lika bra med avseende på kvävereningsgraden, som var nära 80 %.

Tabell 4. Reningsresultat och driftparametrar för försöksblocken

Parameter	Enhet	B2 (Medelvärde $\pm$ SD*)	B3 (Medelvärde $\pm$ SD*)	Antal mätvärden
Slamålder (luftad)	dygn	13 $\pm$ 3,8	8,7 $\pm$ 2,1	22
Slamhalt	mg/l	3300 $\pm$ 340	2300 $\pm$ 250	22
Luftflöde	m ³ /h	3900 $\pm$ 520	4100 $\pm$ 620	152
Kvävereningsgrad	%	79 $\pm$ 6,1	77 $\pm$ 5,0	152
Utgående NH ₄ -N	mg/l	0,51 $\pm$ 0,62	0,65 $\pm$ 0,92	152

*) Standardavvikelse

Under försöksperioden drevs försöksblocken enligt planerna. Vid försökets start drevs Block 2 som Block 3. Därefter höjdes slamåldern i Block 2 successivt medan syrehalten sänktes och efter 4 veckor hade önskad slamhalt uppnåtts (Fig. 4). Slamåldern i Block 2 ökade kraftigt under försökets första del för att sedan minska och stabilisera sig vid ett värde runt 13 – 14 dygns luftad slamålder. Dessa svängningar berodde på inställningstider för att få önskad slamhalt. Hoppen som skedde under vecka 11, 14 och 19 berodde på ändring av antal luftade zoner. Vid två tillfällen under försökets gång stannade en slamskrapa i eftersedimenteringsbassängen till Block 2. Detta upptäcktes under vecka 15, dag 75, och under vecka 23, dag 137. Efter det sista haveriet observerades tidvis flytslam i eftersedimenteringsbassängen i Block 2.



Figur 4. Luftad slamålder i försökslinje B2 (■) och B3 (●).

Under försöket varierades antal zoner som luftades för att upprätthålla driftbetingelserna för utgående ammoniumhalt (Tab. 5). Ammoniumhalten i Block 3 var oftast betydligt lägre än de önskade 1–3 mg NH₄-N. Under veckorna 5–10 och 15–18 luftades zon 4–6 i båda blocken medan endast zon 4–5 luftades de övriga veckorna. Den utgående ammoniumhalten i båda blocken var för höga under veckorna 11–14, vilket var orsaken till att ytterligare en zon började luftas igen. Block 3 drevs med högre syrehalt än Block 2. För att hålla de högre syrehalterna i B3 krävdes det 7 % mer luft (Tab. 5).

Tabell 5. Börvärde för syrehalten i de luftade zonerna i Block 2 och 3

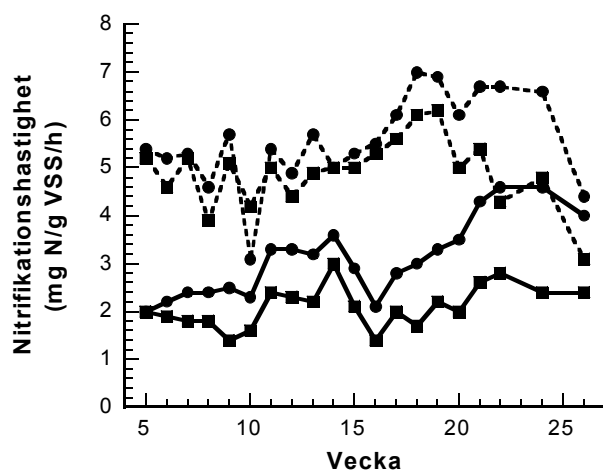
Zon	Syrehalt B2 (mg/l)	Syrehalt B3 (mg/l)
4	2,0	3,0
5	2,0	2–3 ¹
6 ²	2,0	2,0

¹⁾ Vecka 5–10, 2,5; vecka 11, 3; vecka 12–21, 2,5; vecka 22–26 2 mg/l.

²⁾ Gäller vecka 5–10 och 15–18; övriga veckor var syrehalten 0 mg/l.

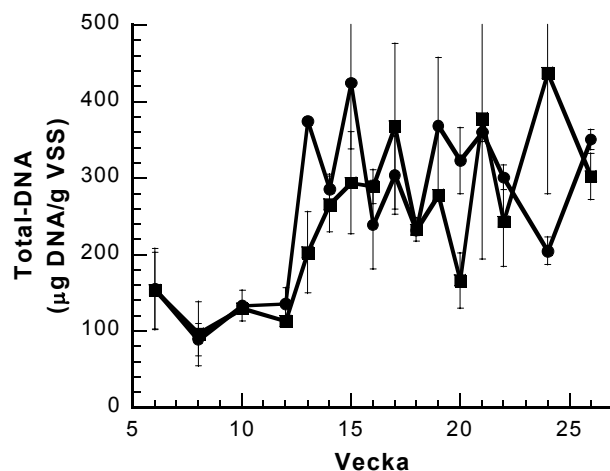
Nitrifikationsstudier

Den aktuella nitrifikationshastigheten, som beräknades genom massbalanser av kväve från dygnsmedelprov, visade att B3 hade en högre hastighet redan efter en vecka (Fig. 6). Hastigheten i B2 var ca 2 mg N/g VSS/h under hela försöket medan hastigheten ökade i B3. Mot slutet hade B3 dubbelt så hög nitrifikationshastighet som B2. Blocken hade samma potentiella nitrifikationshastighet under den första halvan av perioden, men sedan hade B3 en högre hastighet jämfört med B2 (Fig. 6). Den potentiella nitrifikationshastigheten per volymenhet var däremot konstant högre i B2 än i B3 redan två veckor efter försökets start (resultat visas ej). De potentiella hastigheterna var i medeltal $2,4 \pm 0,9$ högre än de aktuella nitrifikationshastigheterna i B2, medan skillnaden i B3 var $1,9 \pm 1,1$. I B3 fanns en trend att skillnaden mellan potentiell och aktuell hastighet minskade under försökets gång.



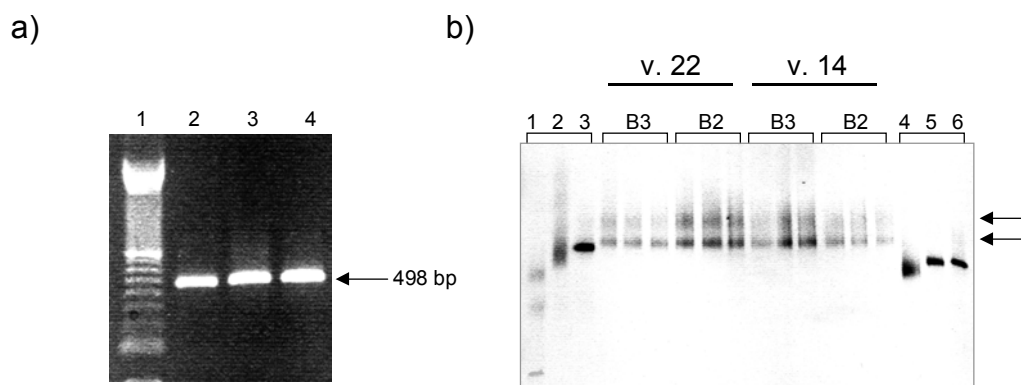
Figur 5. Aktuell (—) och potentiell (---) nitrifikationshastighet per g VSS i linje B2 (■) och B3 (●).

DNA-extrakten, som var utgångspunkten för populationsstudien och kvantifieringen av ammoniumoxiderare, var av god kvalitet och bestod av kromosomalt DNA med en genomsnittlig storlek större än 5000 baspar, enligt analys med agarosgelelektrofores (visas ej). Figur 6 indikerar att totalmängden DNA per gram VSS ökade under försökstidens gång, från januari till juni. Från vecka 8 till vecka 14 låg dock DNA-mängden på en relativt konstant nivå. Trenden är likartad för båda försökslinjerna, som inbördes inte skiljer sig åt. Under försökstiden låg DNA-mängden inom intervallet mellan 100 och 400 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ VSS. Det är viktigt att uppmärksamma att det handlar om total-DNA, vilket inkluderar DNA från alla organismer och inte enbart från bakterier.



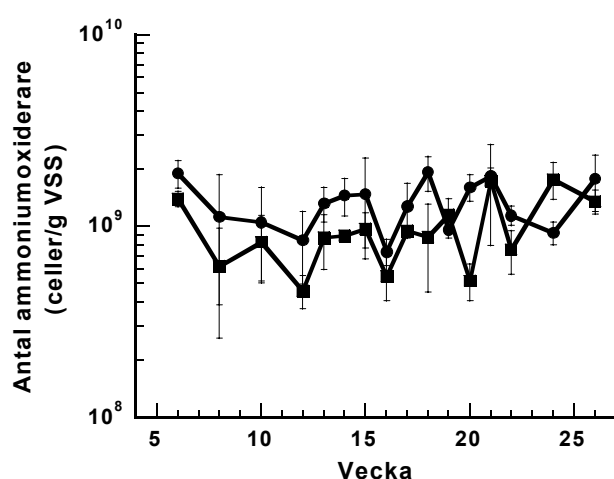
Figur 6. Den totala mängden DNA extraherad från aktivt slam per gram VSS för försökslinje B2 (■) och B3 (●) beräknad med "Picogreen" som färgmarkör. Mätvärdena är angivna som medelvärde av tre oberoende DNA extraktioner $\pm$ standardavvikelse.

Amplifieringen av det specifika fragmentet från ammoniumoxiderare gav högt utbyte utan förekomst av andra band än det förväntade (Fig. 7a). Sammansättningen av ammoniumoxiderare ändrade sig inte under försökets gång och var också lika i de två blocken (Fig. 7b). Enligt jämförelse med bandmönster från renkulturer skulle slammet kunna innehålla ammoniumoxiderare av släktet *Nitrosomonas*. De band som syntes i slamproverna var i position mest lika *Nitrosomonas marina* eller *Nitrosomonas eutropha*. I prov från Block 3 under vecka 8 syntes också svaga band som låg på motsvarande nivå som banden från *Nitrosomonas europaea* i alla tre DNA extrakt. DNA-fragment, som låg i nivå med dem från bakterier tillhörande det ammoniumoxiderande släktet *Nitrospira* detekterades aldrig.



Figur 7. Gelfotografier. a) Specifikt genfragment för ammoniumoxiderare från PCR av slamprov från B2 vecka 15 i triplikat (brunn 2–4) och storleksmarkör 100-baspars stege (brunn 1). b) DGGE av ammoniumoxiderare i slam från B2 och B3 vecka 14 och 22. Två band detekterades i varje prov (pilar). Referensorganismer: *Nitrosomonas europaea*/*Nitrospira multiformis* (brunn 1), *Nitrosomonas eutropha* (brunn 2), *Nitrosomonas marina* (brunn 3), *Nitrosomonas europaea* (brunn 4), *Nitrosomonas* sp. pH4,2 a/23 (brunn 5) och *Nitrosomonas* sp. Env. C19 (brunn 6).

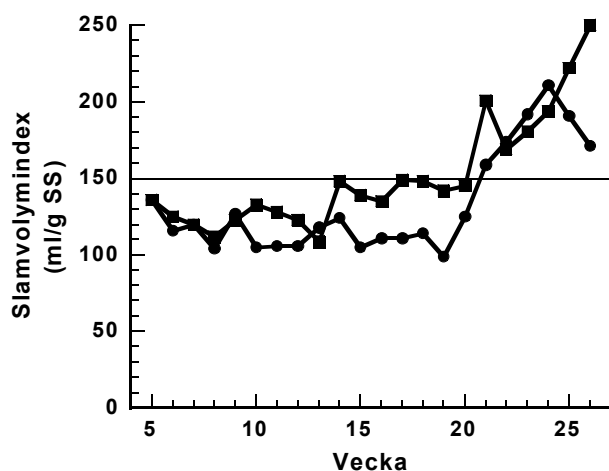
Antalet ammoniumoxiderare per gram VSS var $1,0 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^8$ respektive $1,3 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^8$ i de båda försöksblocken (Fig. 8). Blocken var identiska med $2,0 \times 10^6$ celler per ml slam. Antalet ammoniumoxiderande bakterier relaterat till totalmängden DNA var konstant under hela perioden. Block 2 hade i $3,9 \times 10^6$ celler/ μg total DNA medan B3 hade $4,9 \times 10^6$. Den specifika nitrifikationshastigheten, uttryckt som mängd oxiderat kväve per cell och timme, var i stort sett konstant under hela försöksperioden och skiljde sig inte nämnvärt åt mellan de två försökslinjerna. Medelhastigheten i B2 och B3 var $5,7 \times 10^{-9}$ respektive $4,6 \times 10^{-9}$ mg N/cell/h, vilket motsvarar 0,41 respektive 0,33 pmol N/cell/h. Utifrån den aktuella nitrifikationshastigheten i blocken var den specifika hastigheten 0,15 och 0,17 pmol N/cell/h i Block 2 och Block 3. Det fanns en tendens till att den specifika hastigheten ökade i B3 under de sista fem veckorna.



Figur 8. Antalet ammoniumoxiderande bakterier per gram VSS i försökslinje B2 (■) och B3 (●). Mätvärdena är angivna som medelvärde $\pm$ standardavvikelse av antalet baserat på tre oberoende DNA extraktioner med fem mätningar per extrakt.

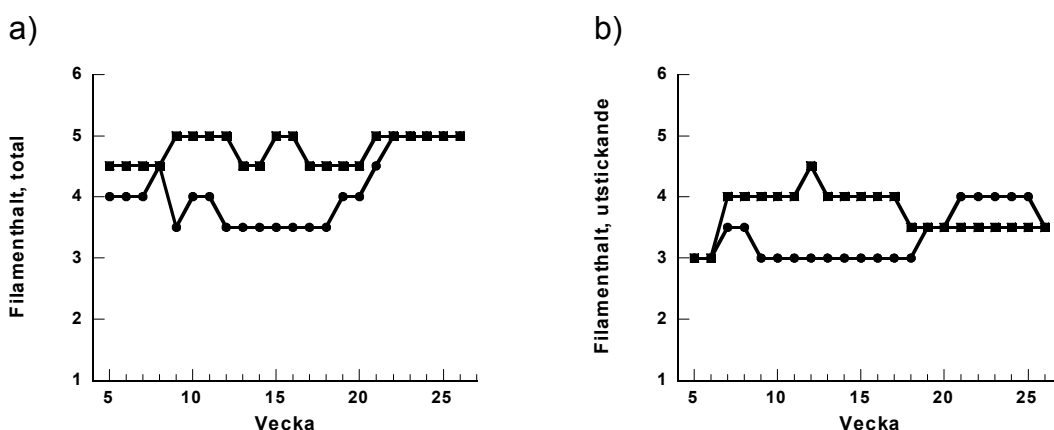
Slamegenskaper

Under de första 5 veckorna av försöket var slamvolymindex i blocken lika, men ökade därefter i Block 2 (Fig. 9). Mot slutet av försöket försämrades slamegenskaperna i båda blocken. Störst förändring skedde i Block 2.



Figur 9. Slammvolymindex (SVI) i försökslinje B2 (■) och B3 (●).

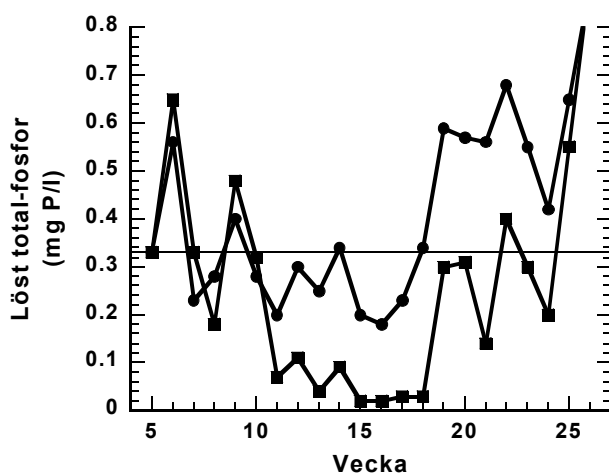
Filamenthalten, både bestämd som utstickande och total filamenthalt, var högre i Block 2 än i Block 3 under större delen av försöksperioden (Fig. 10). Filamenthalten var relativt konstant under försöket med en variation mellan 3,5–5 för total filamenthalt och 3–4 för utstickande filamenthalt. Under de sista fyra veckorna ökade filamenthalten i Block 3, varvid det återigen inte fanns någon skillnad mellan blocken. Halten korta, flyktiga fettsyror (VFA), som indikerar förekomst av längre fettsyror, var under detektionsgränsen (<30 mg/l) under hela försöket.



Figur 10. Subjektiv filamenthalt i försökslinje B2 (■) och B3 (●): a) total filamenthalt och b) utstickande filamenthalt.

Fosfor

Den lösta fosforhalten som studerades dels i utgående vatten och dels i returslammet varierade kraftigt under försöket och var 0,1–0,7 respektive 0,1–0,9 mg/l (Fig. 11). Halterna i utgående avloppsvatten och i returslammet följde varandra. Under de första 10 veckorna var det ingen skillnad mellan blocken men därefter var halten högre i Block 3. Potentialen för fosforfrigörelse i slammet bestämdes till mellan 1,5–5 mg/l och det observerades ingen skillnad mellan blocken. Något samband med höga lösta fosforhalter i utgående vatten och en hög fosforpotential fanns inte. Den högsta potentialen var i början av försöket då frigörelsen i slammet från Block 2 var högre än den i Block 3. Därefter sjönk värdena och skillnaden mellan blocken upphörde.



Figur 11. Löst fosforhalt i returslam, bestämd som total-fosfor i filtrerat prov, i försökslinje B2 (■) och B3 (●). Medelvärde i inkommande vatten var 0,33 mg P/l, vilket är markerat i figuren.

Diskussion

En förutsättning för att kunna välja driftstrategi för effektiv nitrifikation är att förstå hur olika processer fungerar och eventuellt samverkar i en aktivslamprocess med kväverening. Att enbart optimera, styra och övervaka en aktivslamprocess utifrån kemiska och fysikaliska parametrar kan betyda att aktivslamprocessens potential inte utnyttjas till fullo. Yuan och Blackall (2002) menar att vi bör lägga till optimering av slampopulationen, men tyvärr saknas mikrobiologisk data i stor utsträckning. Att optimera slampopulationens sammansättning och egenskaper borde vara en målsättning vid design och drift av reningsverk.

Mikrobiologin i aktivslamprocesser är till stora delar outforskad och slammet innehåller en blandning av kanske hundratals olika bakterier och andra mikroorganismer. Denna blandkultur uppstår spontant i och med att det kommer in organismer till reningsverket via ledningsnätet. Variationer i inkommande vatten gör aktivslamprocessen dynamisk och bakteriefloran kommer ständigt att anpassa sig och förändra sig till de rådande betingelserna. När processen förändras kan också sammansättningen av bakterier i slammet ändras. De som är konkurrenskraftiga och trivs i aktivslamprocessen tillväxer och utgör tillsammans med organiskt material det aktiva slammet, medan de övriga följer med utgående vatten eller dör. Processen gynnar för organismer som bidrar till flockbildningen eller kan vara en del av slamflocken.

Nitrifierande bakterier har en begränsad förmåga att flockulera, men de förekommer som klumpar i slamflockarna (Seviour, 1999). De klarar också alternerande aeroba och anaeroba miljöer. Nitrifierande bakterier har därför inga problem att överleva och tillväxa i aktivslamprocesser, så länge som de faktorer som gynnar dem är tillgodosedda.

Faktorer som styr nitrifikationen

Nitrifierande bakterier har en lägre tillväxthastighet jämfört med de bakterier som bryter ner organiskt material i aktivslamprocesser. För att de nitrifierande bakterierna skall arbeta optimalt i en aktivslamprocess är slammets aeroba uppehållstid, den aeroba slamåldern, den mest kritiska faktorn med tanke på bakteriernas långsamma tillväxt. Tillväxthastigheten hos ammoniumoxiderare är lägre än hos nitritoxiderare, vilket gör att slamåldern måste anpassas till de ammoniumoxiderande bakterierna i slammet för att undvika att förlora nitrifikationen (Blackall och Burrell, 1999). Risken för utspolning är mycket stor om slamåldern underskrider 5 dygn enligt flera studier (Seviour, 1999). Slamåldern tillsammans med vattnets aeroba uppehållstid och nitrifikationshastigheten påverkar nitrifikationsgraden och styr dimensioneringen vid reningsverk med biologisk kvävereduktion. Nitrifikationshastigheten är beroende av ett antal miljöfaktorer:

- syrehalt
- temperatur
- pH/alkalinitet
- hämmande ämnen

Av dessa faktorer är det främst syrehalten vi kan kontrollera. Syrehalten och slamåldern samverkar på så sätt att vid en låg slamålder bör den lösta syrehalten vara högre än vid hög slamålder för att uppnå samma nitrifikationsgrad. Den kritiska slamåldern vid ett reningsverk kan därför varieras med hjälp av syrehalten. I detta projekt vid Henriksdals reningsverk var syrehalterna 2,0 och 2,8 mg/l i medeltal i B2 respektive B3 under försöksperioden och den aeroba slamåldern var relativt hög (13 respektive 9 dygn). Nitrifikationsgraden var god under hela försöket och den aeroba slamåldern i båda blocken var därmed högre än den kritiska slamåldern. Hur nära den kritiska slamåldern processerna var går inte att avgöra eftersom slamåldern aldrig varierades. Däremot var det tydligt att Block 3, med den lägre slamåldern, hade en lägre nitrifikationsgrad än Block 2 under veckorna 11–14 då luftningen i den sista aeroba zonen stängdes av i båda blocken. Halten ammonium i utgående vatten ökade och var nästan 7 mg N/l från Block 3, vilket var dubbelt så mycket som från Block 2.

Val av slamålder styrs också av temperaturen eftersom tillväxthastigheten minskar vid sjunkande temperatur. I Sverige är därför slamåldern ofta högre än vad som är vanligt i många andra länder. Temperaturen under försöket var mellan 10 och 17°C och den aeroba slamåldern på 9 dygn i Block 3 var högre än den kritiska slamåldern även när det var som kallast. Temperaturens inverkan på nitrifikationen syntes när luftningen i den sista aeroba zonen stängdes av veckorna 11–14 och 19–26. Vid första tillfället var det för kallt och ammoniumhalten i utgående vatten ökade, och då mest i Block 3, medan färre antal aeroba zoner var fullt tillräckligt vid slutet av försöket.

Nitrifierande bakterier växer normalt mer långsamt i reningsverk än i renkulturer eller i andra miljöer (Blackall och Burrell, 1999). Det beror förmodligen på förekomst av hämmande ämnen i avloppsvattnet och för låga syrehalter. Flera svenska reningsverk har rapporterat hämning av nitrifikationen, men ingen hämning kunde noteras i försöken vid Henriksdals reningsverk. Vid hämning syns det tydligt att ammoniumhalten i utgående vatten hastigt ökar. I många fall går det inte att avgöra vad som hämmat processen. Det aktiva slammet kan ofta hämta sig snabbt när halten av det hämmande ämnet minskar. För att få igång processen om nitrifikationen slagits ut kan man ympa ”friskt” slam från en annan del av verket eller ett annat reningsverk.

Populationsstudier av ammoniumoxiderande bakterier

I undersökningen av slamålderns och syrehaltens effekter på de nitrifierande bakteriepopulationerna i aktivslamprocessen vid Henriksdals avloppsreningsverk var målsättningen att få kunskap om såväl populationsstruktur ur ett kvalitativt perspektiv, det vill säga vilka arter eller stammar som fanns i slammet, som antalet av bakterierna. Genom att räkna nitrifierarna gavs också möjligheter att beräkna den nitrifierande aktiviteten per bakteriecell och att teoretiskt beräkna andelen ammoniumoxiderande bakterier av totala bakterieantalet utifrån vissa förutsättningar.

De ammoniumoxiderande populationerna bestod över tiden

De ammoniumoxiderande populationerna var lika i B2 och B3, trots olika driftstrategier, och sammansättningen förändrades inte heller över tiden enligt DGGE-profilerna. Utan att analysera banden från DGGE-profilerna närmare går det inte att med säkerhet uttala sig om artsammansättningen, men enligt jämförelse med

bandmönster från renkulturer dominerades slammet av band liknade dem från släktet *Nitrosomonas*. Detta släkte framträder oftast i näringsrika miljöer och är vanligt förekommande i aktivt slam (Wagner m.fl., 1995; Mobarry m.fl. 1996; Schramm m.fl., 1996). I naturliga ekosystem, som mark, sjöar och vattendrag, är *Nitrospira* det vanligaste släktet av ammoniumoxiderande bakterier (Hiorns m.fl., 1995; Stephen m.fl., 1996; Kowalchuk m.fl., 1997).

I slammet från Henriksdals reningsverk var DGGE-profilerna mest lik profilerna av de från *Nitrosomonas marina* eller *Nitrosomonas eutropha*. I en undersökning av 11 reningsverk (6 med aktivslamprocesser och 5 med biofilm) i Tyskland påvisades nitrosomonader i alla verken medan nitrospiror endast fanns i två av dessa (Purkhold m.fl., 2000). Populationen av ammoniumoxiderande bakterier undersöktes under ett års tid av Dionisi m.fl. (2002) i ett kommunalt reningsverk. Alla gensekvenser från slamproverna kom från släktet *Nitrosomonas*. I ett vattenreningssystem med en fluidiserande bädd som renade vatten med låga ammoniumhalter identifierades ammoniumoxiderare enbart från släktet *Nitrospira* med FISH (Schramm m.fl., 1998). Systemet liknade dock mest miljön i en näringsfattig sötvattensjö.

Med DGGE påvisas förekomsten av de bakterier vars DNA är extraherbart med extraktionsmetoden och som också sedan amplifieras vid PCR-reaktionen. I denna studie, liksom i andra med samma metodik, är det omöjligt att veta i vilken utsträckning extraktionsmetoden är selektiv. Vi vet dock från andra försök att DNA från både nitrosomonader och nitrospiror kan extraheras från olika jordprover med samma metod som använts i denna studie (Bäckman m.fl. manuskript; Nyberg m.fl. manuskript). De primrar som användes för PCR-amplifiering är framtagna för ammoniumoxiderande bakterier, men det har visat sig att de inte alltid är så specifika utan också kan amplifiera sekvenser från andra bakterier (Stephen m.fl., 1996). I undersökning av populationerna i slam från B2 och B3 kan därför någon annan organism detekterats på grund av otillräckligt specifik bindning av primrarna, eller så kan några ammoniumoxiderare blivit uteslutna. Det förra problemet kan dock spåras om man sekvenserar banden i DGGE-profilerna.

Antalet ammoniumoxiderande bakterier förändrades inte

Antalet ammoniumoxiderare var ca 2×10^6 celler/ml prov (1×10^9 celler/g VSS), i både försökslinje B2 och B3 (Tab. 6). Nivån låg relativt konstant under försöket och de olika driftsstrategierna i B2 och B3 påverkade inte antalet ammoniumoxiderande bakterier. Utifrån aktivitetsmätningar antog Jones och Sabra (1980) att en förhöjd slamålder skulle leda till en ökning i antalet ammoniumoxiderare. Båda försöksblocken vid Henriksdal visade en oregelbunden periodicitet i antalet ammoniumoxiderande bakterier, men förändringarna var små. De berodde med stor sannolikhet på en naturlig variation av populationsstorleken eftersom mönstret var det samma för antalet celler per volymenhet som för antalet per g VSS.

I denna studie har vi använt realtids-PCR framför allt beroende på svårigheter att direktdetektera eller odla nitrifierande bakterier på laboratorium. Den är tillsammans med den av Dionisi m.fl. (2002), så vitt vi vet, de enda långtidsstudier av ammoniumoxiderande bakterier i aktivslamprocesser som har genomförts med en kvantitativ PCR-metod. Liksom vid vanlig PCR är det också vid realtids-PCR och kompetitiv PCR svårt att uppskatta huruvida primrar och sond ger en under- eller

överskattning av det verkliga antalet bakterier. Enligt en databassökning hade primrarna och sonden riktade mot ammoniumoxiderande bakterier i denna studie en god specificitet.

Tabell 6. Sammanställning av olika metoder som använts för kvantifiering av ammoniumoxiderande bakterier (AOB) i aktivslamprocesser

Metod	Mål-organism	Antal (celler/ml)	Anmärkning	Referens
FISH ¹	<i>Nitrosomonas spp.</i>	$6,5 \times 10^8$	Industriellt avlopp (slakteriavfall & gödsel)	Wagner m.fl., 1995
Antikroppar	<i>Nitrosomonas europaea</i>	$8,4 \times 10^5$	Laboratorieskala	Jones, 1981
MPN ²	AOB	$4,3 \times 10^1$	Laboratorieskala	Jones, 1981
MPN	AOB	$\leq 7,2 \times 10^3$	Kommunalt avlopp	Strom m.fl., 1976
MPN	<i>Nitrosomonas</i> och <i>Nitrospira</i>	$2,7 \times 10^{10}$	Industriellt avlopp (kalvgödsel)	Kowalchuk m.fl., 1999
cPCR ³	AOB	$5,2 \times 10^{10}$	Industriellt avlopp (kalvgödsel)	Kowalchuk m.fl., 1999
cPCR	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> liknande	$4,3 \times 10^4 - 4,1 \times 10^5$	Kommunalt avlopp	Dionisi m.fl., 2002
Realtids-PCR	AOB	$9,9 \times 10^5 - 3,6 \times 10^6$	Kommunalt avlopp	Denna studie

¹⁾ "Fluorescent *In Situ* Hybridization", en fluorescerande nukleinsyramolekyl som binder till RNA eller DNA i ett fixerat miljöprov. Studeras i fluorescens- eller konfokal-lasermikroskop. Används för att identifiera en viss grupp organismer "på stället" i ett prov.

²⁾ "Most-Probable-Number-Method", odling av bakterier från ett miljöprov i en spädningsserie där man beräknar det sannolika antalet bakterier som ursprungligen fanns i provet.

³⁾ "Competitive PCR", PCR metod med samtidig amplifiering av DNA från prov och från en intern standard med känd DNA-koncentration.

Dionisi m.fl. (2002) räknade antalet ammoniumoxiderare med kompetitiv PCR baserad på *amoA* genen (gen som kodar för ett enzym i ammoniumoxidationen) med provtagning en gång i månaden i ett kommunalt reningsverk och fann att antalet inte varierade under året (Tab. 6). *Nitrosomonas oligotropha*-liknade ammoniumoxiderare dominerade i den process som undersöktes och metoden var därför utvecklad för att kvantifiera dessa, vilket medför en risk för att antalet ammoniumoxiderare underskattades något. Antalet i den studien var mellan 10 och 100 gånger lägre än vad som uppmättes vid Henriksdal både på volym och VSS basis. Wagner m.fl. (1995) bestämde antalet ammoniumoxiderande bakterier med FISH i en aktivslamprocess, som behandlade slakteriavfall och gödsel, och fann mellan 100 och 500 gånger fler celler än vad som uppmättes vid Henriksdal. Eftersom FISH bygger på delvis andra förutsättningar än realtids-PCR är det dock svårt att direkt jämföra resultaten. Även Kowalchuk m.fl. (1999) detekterade ett högt antal ammoniumoxiderare med cPCR i en aktivslamprocess som var avsedd för rening av kalvgödsel (Tab. 6).

Antalet ammoniumoxiderare som bestämdes i försöksblocken vid Henriksdals reningsverk var ca 1000 gånger högre än vad som har uppmätts med MPN-metodik i en annan studie (Strom m.fl., 1976). Detta är inte så underligt med tanke på att man vid MPN-bestämning i regel får en underskattning av antalet ammoniumoxiderare, dels

beroende på att metoden bygger på odling och dels eftersom det är svårt att slå sönder bakterieaggregaten. Jones (1981) visade att MPN gav 10–1000 gånger lägre antal ammoniumoxiderare i jämförelse med bestämning med antikroppar. I en undersökning av Kowalchuk m.fl. (1999) var däremot antalet ammoniumoxiderare lika oavsett om det bestämdes med MPN eller cPCR, vilket kan tyda på att en stor del av ammoniumoxiderarna i dessa prover var aktiva och därför odlingsbara (Tab. 6).

Andelen ammoniumoxiderare av bakterierna i slammet

DNA extraktionerna visade en viss ökning totalmängden DNA/g VSS över tidsperioden från januari till juni i båda försökslinjerna. Vid de flesta tillfällena var mängden något större i B3 än i B2. Ökning av den totala DNA mängden påverkade inte antalet ammoniumoxiderare över tiden, som ju låg på en relativt konstant nivå. Andelen ammoniumoxiderare tenderade därför att öka i försöksblocket med lägre slamålder.

I studien gjordes inga bestämningar på det totala bakterieantalet i proverna, men vid antagandet att allt extraherat DNA kom från bakterier uppskattades antalet bakterier till $5,3 \times 10^7$ och $4,2 \times 10^7$ celler/ml i B2 respektive B3 (under förutsättning att bakterierna hade en genomsnittlig genomstorlek av $4,6 \times 10^6$ baspar och 2,1 genom per cell; Madigan m.fl., 1997). Den teoretiska uppskattningen av andelen ammoniumoxiderare vid Henriksdal var 3,8 % i Block 2 och 4,7 % i Block 3. Andelen nitrifierare i en typisk aktivslamprocess anses vara mellan 2 och 5 % av biomassan (Randall, 1992). I den senaste versionen av "Activated Sludge Model" (ASM3) uppskattades de nitrifierande bakterierna till 2–3 % av den totala biomassan i aktivslamprocesser i kommunala reningsverk (Koch m.fl., 2001). Nyare studier med kvantitativ PCR visar däremot på att andelen ammoniumoxiderande bakterier kan vara så låg som 0,0033 % (Dionisis m.fl. 2002). Dessa värden och de i denna studie är betydligt lägre än då Wagner m.fl. (1995) uppskattade andelen ammoniumoxiderare i aktivt slam till 15 %. De höga värdena räknades fram utifrån antalsbestämning med FISH. Prov togs dock endast vid två tillfällen i ett industriellt reningsverk med ovanligt höga ammoniumhalter i inkommande vatten (ca 760 mg N/l).

Lägre slamålder kan ge effektivare nitrifikation

Halten suspenderad substans (SS) och organiskt material (VSS) var, som väntat, lägre i B3, på grund av den lägre slamåldern. Det medförde att den potentiella nitrifikationshastigheten per VSS var högre där än i B2. Slammet var därmed aktivare i B3 än i B2 och skillnaden mellan blocken syntes tydligt efter halva försöksperioden (Fig. 5). Nitrifikationshastigheten, liksom denitrifikationshastigheten, brukar öka när slamåldern sänks så länge man inte underskrider den kritiska slamåldern (Jones och Sabra, 1980). Däremot kan nitrifikationsgraden öka när slamåldern ökar. Från försök med satsvis biologisk behandling i en reaktor (SBR-teknik) fann man att nitrifikationshastigheten (ammoniumoxidation till nitrit) ökade med sjunkande slamålder vid aerob drift, men när reaktorerna drevs med alternerande aeroba/anaeroba förhållanden syntes indikationer på att syrehalten kanske hade större effekt på ammoniumoxidationen än slamåldern (Pollice m.fl., 2002).

Beräkningarna från massbalanser av kväve visade att de aktuella nitrifikationshastigheterna i bassängerna redan efter en vecka var högre i B3 och mot

slutet av försöket var den aktuella hastigheten där nästan lika stor som den potentiella. Det omsattes alltså mer kväve per VSS i blocket med lägre slamålder och högre syrehalt. Skillnaden i nitrifikationshastighet hade dock ingen effekt på kvävereningen, som var lika god i båda blocken.

Nitrifikationshastighet per cell

De aktuella och potentiella nitrifikationshastigheterna och de uppmätta värdena på antalet ammoniumoxiderande bakterier användes för att beräkna den nitrifierande hastigheten per cell, den så kallade specifika hastigheten. Den var densamma oberoende av slamåldern i blocken under större delen av försöket. Det fanns dock en tendens till att den specifika nitrifikationshastigheten i slammet ökade i Block 3 under de sista fem veckorna. Det tyder på att en driftstrategi med lägre slamålder och högre syrehalt skulle kunna höja aktiviteten per cell.

I denna studie var den potentiella specifika hastigheten 0,41 och 0,33 pmol/cell/h i B2 respektive B3 medan den aktuella specifika hastigheten var 0,15 och 0,17 pmol/cell/h, som medelvärden för hela försöksperioden. Hastigheterna var betydligt högre än de 0,00022 pmol/cell/h som Wagner m.fl. (1995) uppmätt i studier med FISH, men i samma nivå med vad som har uppmätts för renkulturer av nitrifierare under optimala förhållanden. Det kan tyda på att antalet ammoniumoxiderare i denna studie underskattades. En annan aspekt är att antalet i denna studie beräknats utifrån DNA och då är förmodligen inte alla celler som detekterats aktiva. Den specifika hastigheten skulle därmed vara ännu större än den vi uppmätte.

Sedimenteringsegenskaperna opåverkade av slamåldern

I försöken vid Henriksdals reningsverk var det väsentligt att också titta på slamegenskaperna när effekten av slamålder på nitrifikationen utvärderades. Goda slamegenskaper kännetecknas av snabb sedimentering och kompaktering av slam med stabila flockar. I en aktivslamprocess är den biologiska aktiviteten koncentrerad till flocken. Flockar renar även vattnet genom att partiklar, som är så lätta att de inte kan sedimentera av egen kraft, adsorberas till flockarna. Reningsgraden är därför helt avhängig flockens egenskaper.

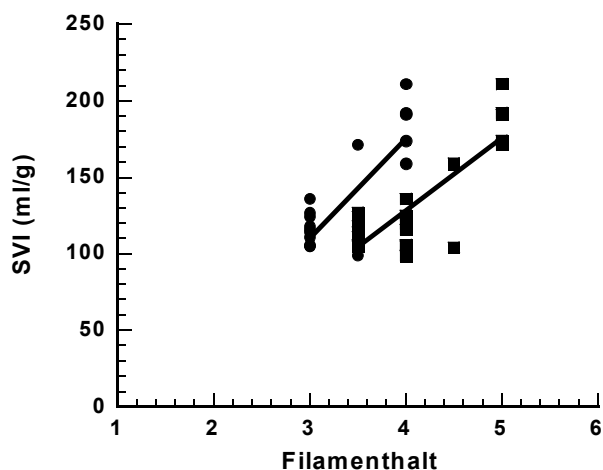
I studien mättes slamvolymindex (SVI) som mått på sedimenteringsegenskaperna och halten av filamentbildande organismer bestämdes. Slamvolymindex och filamenthalt är vanliga parametrar att kontrollera för att upptäcka problem med slamsvällning tidigt. Slamsvällning innebär att slammet sedimenterar långsamt och inte kompakterar i sedimenteringsbassängen. Det finns ett antal andra sedimenteringsproblem förutom slamsvällning, men det tillsammans med skumning är de i särklass vanligaste bekymren i aktivslamprocesser över hela världen (Seviour, 1999b). Både slamsvällning och skumning beror oftast på ökad förekomst av filamentbildande bakterier. De filamentbildande bakterierna är dock en normal del av flocken och vid låga halter spelar de en viktig roll för flockens struktur där de fungerar som armering (Jenkins, 1993).

Höga halter av filament trots acceptabelt SVI

Skillnaden i slamegenskaper mellan försöksblocken var mindre än förväntat. Under första delen av försöket var slamvolymindex mellan 100 och 140 ml/g i båda blocken,

vilket är acceptabla nivåer. Brytpunkten för då slamsvällning kan förväntas anses vara vid slamvolymindex större än 150 ml/g (Jenkins m.fl., 1993). Block 3, som hade lägre halt suspenderad substans, hade sedan lägre slamvolymindex än B2, men mot slutet av försöket var slamvolymindex större än 150 ml/g i båda blocken (Fig. 9). Block 2 hade flytslam i sedimenteringsbassängen från vecka 15 och framåt. En trolig orsak kan vara att en av slamskraporna vid flera tillfällen stod still i det försöksblocket. För övrigt fanns det inga sedimenteringsproblem i försöken.

Den totala filamenthalten var relativt hög under hela försöket. Den ökade i B3 mot slutet, vilket ledde till att den skillnad som tidigare fanns mellan blocken försvann. Bedömningarna från den förenklade, subjektiva skalan enligt Jenkins m.fl. (1993) gav värden mellan 3,5 och 5 för total filamentförekomst under försöksperioden. Det betyder att det fanns många filament i alla flockar. Frekvensen 1–5 filament per flock (grad 3) och uppåt motsvarar ett spätt slamvolymindex (DSVI) större än 150 ml/g (Seviour, 1999). Sambandet mellan slamvolymindex och filamenthalt har diskuterats (Jenkins, 1993). I denna studie korrelerade SVI positivt med både total och utstickande filamenthalt i Block 3 (Fig. 12), medan det inte fanns något samband alls i Block 2. I blocket med hög slamålder (B2) var filamenthalten genomgående hög, medan SVI gradvis ökade under försöksperioden. Andra faktorer, till exempel flockstorlek och flockkompakthet, kan också ha inverkat på SVI.



Figur 12. Samband mellan slamvolymindex och total (■) samt utstickande filamenthalt (●) i försöksblock B3 med låg slamålder. $R=0,83$ för total filamenthalt och $R=0,80$ för utstickande filamenthalt.

Slamsvällning är ett komplext problem och det finns flera teorier över vad det beror på. De filamentbildande bakterierna har i alla fall en avgörande roll. Det finns idag mer än 30 kända olika typer av filamentbildare som bidrar till slamsvällning och av dessa är det ca 10 som står för minst 90 % av rapporterade incidenter (Blackall, 1999). Filamenten har olika morfologi och olika förmåga att växa ut ur flocken. De har därför olika effekt på sedimenteringen. Utstickande filament från flocken gör att flockarna hakar i varandra medan filament inuti flocken skapar hålrum och hindrar kompakteringen. I försöken vid Henriksdal var halten utstickande filament vanlig i B3 och mycket vanlig i B2 under

större delen av försöket. I slutet var dock den utstickande filamenthalten högre i B3 än i B2.

Halten korta, flyktiga fettsyror mättes varje vecka, men var alltid under detektionsnivån (<30 mg/l). En ökad VFA-halt indikerar hydrolys i sedimenteringen. Det kan betyda att slammet också innehåller längre fettsyror, vilka anses gynna filamentbildare som "*Microthrix parvicella*". Korta fettsyror kan i sin tur leda till spontan denitrifikation i sedimenteringen vid närvaro av nitrat och orsaka flytslam.

Ibland läckte slammet fosfor

Vid Henriksdals reningsverk har personalen tidigare noterat att det ibland plötsligt frigörs fosfor från slammet i sedimenteringsbassängen. Detta bidrar till höjda fosforhalter i utgående vatten och i slutänden till ökad användning av fällningskemikalier. Orsaken till fosforläckage antogs vara kopplad till hög slamålder.

Fosforhalten i både utgående vatten och i returslammets vätskefas varierade kraftigt under försöket och B3 hade högre halter av totalfosfor i returslammet än B2. Studien visar att relativt stora mängder fosfor tidvis frigörs från slammet, vilket gör att fosforhalterna i vattnet ökar efter det biologiska steget. De högre fosforhalterna i blocket med den lägre slamåldern skulle kunna bero på biologisk fosforaktivitet. Det finns bakterier som lagrar fosfat i cellerna som polyfosfater och frigör detta i anaeroba miljöer då de samtidigt tar upp korta fettsyror som acetat (Bond och Rees, 1999). Tillväxt av dessa organismer gynnas av en lägre slamålder snarare än en hög. Det fanns inget samband mellan fosforhalt i slammet och potentialen för fosforläckage. I potentialtesten var det ingen skillnad på försöksblocken. Det var endast under tiden som slamhalten byggdes upp i B2 som potentialen var hög, men när överskottsslamuttaget stabiliserades sjönk den och B2 och B3 var sedan så gott som identiska med avseende på potential för fosforläckage. Antagandet att en högre slamålder skulle ge ett större fosforläckage från slammet stämde alltså inte utifrån de data som presenteras.

De tre mätningar som gjordes av potentiell fosforfrigörelse med åtta provpunkter, istället för enbart start och slutvärde, under åtta timmar visade att slammet släpper ifrån sig det mesta av fosfor tidigt under inkuberingen. Från kurvorna i denna studie avges fosfor snabbare från slammet i B3 än B2 under inkuberingens första halvtimme. Påståendet är spekulativt då det endast baseras på en mätpunkt, men per g VSS är hastigheten nästan dubbelt så hög. Mer information om fosfordynamiken skulle kunna erhållas om testet utformades annorlunda med täta provtagningar under en kortare inkubering. Då skulle även hastigheten kunna beräknas.

Den praktiska betydelsen för reningsverken

Det omsattes mer kväve per VSS i blocket med lägre slamålder och högre syrehalt, men kvävereningsgraden var densamma som i blocket med högre slamålder och lägre syrehalt. Den förstnämnda strategin medgav ett visst ammoniumläckage från verket och en större energiförbrukning till blåsmaskinerna medan den senare strategin innebar att det fanns 40 % mer slam i systemet. I försöken vid Henriksdals reningsverk blev inte slamegenskaperna sämre vid drift med högre slamålder. Att driva processen med

mycket slam i biosteget gav mindre problem än förväntat. Val av driftsstrategi handlar om det enskilda verkets förutsättningar och mål. De frågor de driftsansvariga vid ett reningsverk bör ställa sig är:

- Vad kan vi vinna på att ha ett slam med effektivare nitrifikation?
- Har vi råd med ammoniumläckage vid utsläppskravkrav på 10 mg N/l?
- Vad betyder energiförbrukningen?
- Finns det problem med slamsvällning eller skumning?
- Vilken kapacitet har sedimenteringsbassängerna?
- Vad betyder en ökad eller minskad slamproduktionen?
- Hur mycket fosfor frigörs från det biologiska reningssteget?

Nitrifierarnas antal och sammansättning

Att de ammoniumoxiderande populationerna inte förändrades i sammansättning eller antal tyder på att de är väl anpassade för miljön vid Henriksdals reningsverk. Inom den variation av slamålder och temperatur som försöket gjordes var populationen oförändrad, vilket betyder att den är tämligen robust. Stora förändringar i artsammansättning eller antal skulle kunna påverka den genomsnittliga tillväxthastigheten av nitrifierande bakterier i aktivt slam. En sådan skillnad skulle ha direkt effekt på styrning och optimering av processen med till exempel slamålder. Att nitrifierarpopulationen inte förändras är också positivt om man skall kalibrera en modell för ett specifikt verk.

Filamentbildare och slamsvällning

Forskare har försökt hitta drifts- och miljöfaktorer som påverkar förekomsten av filament, men dessa är inte entydiga. Ibland kan slamegenskaperna vara bra trots höga filamenthalter, som visats i denna studie. Att regelbundet mikroskopera slammet i en aktivslamanläggning kan dock rekommenderas. Alla verk kommer förr eller senare att drabbas av problem med slamsvällning eller skumning och genom att känna till slammets utseende och variationen i filamentförekomst och koppla det till övriga driftsparametrar kan en referensram för det egna verket byggas upp. Det kan vara ett verktyg för att skapa driftsstrategier så att filamenthalten kan kontrolleras (Rothman, 1998). Plötsliga eller gradvisa förändringar i slammets utseende kan vara en varningssignal.

Fosfor och kemisk fällning

Under försöksperioden var fosforhalterna ut från biosteget högre än vad som gick in. Orsaken till de tidvis höga, fosforhalterna i utgående vatten borde studeras vidare för att kunna optimera reningen av fosfor i efterföljande filtersteg. Att fosfor frigörs sporadiskt i slammet betyder att doseringen av fällningskemikalier i efterfällningen skulle kunna regleras bättre. En förutsättning för det är att det finns ett sätt att detektera när fosfor släpper från slammet. Kraven på fosforreduktion är mycket höga idag och fällningskemikalier är en dyr utgift för reningsverken. Om efterfällning kan optimeras för att möta fosfortopparna i vattnet skulle det gå att göra en del besparingar.

Ekonomi

De högre syrehalterna som krävs vid drift med en lägre slamålder är en stor utgiftspost för ett reningsverk. För att producera 1 m³ luft/h på Henriksdal åtgår ca 0,025–0,035 kW (Waltin, 2000). För att upprätthålla de högre syrehalterna i Block 3 krävdes det ungefär 1400 m³ luft/h vilket motsvarar ett ökat energibehov på 370 000 kWh/år, beräknat på hela anläggningen. En annan faktor som påverkar driftkostnaden negativt för strategin med den lägre slamåldern är behandling för överskottslam. En process med en hög slamålder producerar mindre slam än en med låg, men eventuella problem med flytslam i en process med hög slamålder innebär också ökade arbetskostnader.

Varför var det inte så stor skillnad?

Det fanns aldrig några stora skillnader mellan blocken i försöket med olika slamåldrar och syrehalt med avseende på de biologiska och kemiska parametrar som mättes. Varför blev det ingen större skillnad? Frågan är om denna likhet bara var en tillfällighet? Hade försöken fortsatt under en längre period hade det kanske blivit annorlunda. Det visar på betydelsen av att driva försök under lång tid – gärna ett år. Skillnaden i slamålder och syrehalt mellan de två blocken kanske var för liten för att verkligen kunna kallas två olika driftstrategier? Det öppnar för intressanta funderingar över hur vida ramarna egentligen är. Hur många driftsansvariga vet var gränserna går i sitt verk? Två andra viktiga frågor är hur många parametrar som måste följas och hur ofta bör man mäta dessa för övervakning. Det finns en tendens att allt fler prover tas och att allt fler "on-line mätare" installeras. Det väsentliga vid driften av ett reningsverk kanske hellre är att bygga upp en kunskapsbas över verket så att man vet inom vilket område driften är stabil och vet vilka de kritiska parametrarna är.

Slutsatser

Två olika driftstrategier, en med hög slamålder och låg syrehalt och en med låg slamålder och hög syrehalt, prövades i två block vid Henriksdals reningsverk. Syftet var att utvärdera dessa med avseende på de nitrifierande bakteriernas kapacitet och sammansättning samtidigt som eventuell negativ inverkan på slamegenskaperna och fosforeringen undersöktes. Vi drar följande slutsatser från studien:

- Det fanns inga stora skillnader mellan driftstrategierna utifrån de kemiska och biologiska parametrar som mättes.
- Lägre slamålder gav effektivare nitrifikation. Det omsattes mer kväve per VSS i blocket med låg slamålder än det med hög, men kvävereningsgraden var densamma.
- De var ingen skillnad i de ammoniumoxiderande populationernas antal eller sammansättning trots olika slamåldrar och detta förändrades inte heller över tiden. Däremot var andelen ammoniumoxiderande bakterier i slammet något högre i blocket med lägre slamålder liksom aktiviteten per cell i slutet av försöket.
- Slamegenskaperna försämrades inte vid drift med högre slamålder. Filamenthalten var relativt hög i båda försöksblocken, men hög filamenthalt var inte alltid entydigt med dåliga sedimenteringsegenskaper.
- En låg slamålder bidrog till att mer fosfor frigjordes i biosteget. Orsaken borde studeras närmare.

Referenser

- Avprövning av screeningmetoder för nitrifikationshämning*. 1993. Vandkvalitetsinstitutet, Danmark.
- Blackall, L. L. och Burell, P. C. 1999. The microbiology of nitrogen removal in activated sludge. I: *The microbiology of activated sludge*, R. J. Seviour och L. L. Blackall (Red.), s. 203–226, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Blackall, L. L. 1999. Bulking. I: *The microbiology of activated sludge*, R. J. Seviour och L. L. Blackall (Red.), s. 147–160, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Bond, P. L. och Rees, G. N. 1999. Microbiological aspects of phosphorus removal in activated sludge systems. I: *The microbiology of activated sludge*, R. J. Seviour och L. L. Blackall (Red.), s. 227–256, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Bäckman, J., Hermansson, A., Tebbe, C. C. och Lindgren, P.-E. Effect of liming on the diversity of ammonia-oxidizing bacteria in a coniferous forest soil as determined by PCR amplification of partial 16S rRNA genes. Manuskript.
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G. och Sayler, G. S. (2002). Quantification of Nitrosomonas oligotropha-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 245–253.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. och Williams, P. M. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6:986–994.
- Hermansson, A. och Lindgren, P.-E. 2001. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 972–976.
- Hiorns, W. D., Hastings, R. C., Head, I. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R., Pickup, R. W. och Hall, G. H. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrospiras in the environment. *Microbiology*, **141**, 2793–2800.
- Jenkins, D., Richard, M. G. och Daigger, G. T. 1993. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2:a uppl., Lewis Publishers: Boca Raton.
- Jones, D. D. (1981). *Studies of Nitrification in a Coke-Waste Activated Sludge Process*. Springfield VA: National Technical Information Service.
- Jones, P. H. och Sabra, H. M. 1980. Effects of systems solids retention time (SSRT or sludge age) on nitrogen removal from activated-sludge systems. *Water Pollution and Control*, **79**, 106–116.
- Koch, G., Kühni, M. och Siegrist, H. 2001. Calibration and validation of an ASM3-based steady-state model for activated sludge systems. Del 1. Prediction of nitrogen removal and sludge production. *Water Research*, **35**, 2235–2245.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. och Woldendorp, J. W. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1489–1497.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. och Parker, J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8:e uppl., Prentice hall: New York.
- Mobarry, B., Wagner, M., Rbain, V., Rittman, B. E. och Stahl, D. A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 2156–2162.
- Nyberg, K., Jarvis, Å. Sundh, I., Hallin, S. och Schnürer, A. Effects of organic waste residues on the structure and function of ammonia-oxidizing bacteria and microbial diversity in soil. Manuskript.
- Pollice, A., Tandoi, V. och Lestingi, C. 2002. Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Research*, **36**, 2541–2546.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. och Wagner, M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5368–5382.
- Rothman, M. 1998. Operation with biological nutrient removal with stable nitrification and control of filamentous bulking. *Water Science and Technology*, **37**, 549–554.
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. och Amann, R. 1998. Identification of activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. As dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3480–3485.
- Seviour, R. J. 1999a. The normal communities of activated sludge plants. I: *The microbiology of activated sludge*, R. J. Seviour och L. L. Blackall (Red.), s. 87, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Seviour, R. J. 1999b. Factors affecting the occurrence of filamentous bacteria in activated sludge plants. I: *The microbiology of activated sludge*, R. J. Seviour och L. L. Blackall (Red.), s. 99–121, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
- Stephen, J. R. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:4147–4154.
- Strom, P. F., Matulewich, V. A. och Finstein, M. S. 1976. Concentrations of nitrifying bacteria in sewages, effluents, and a receiving stream and resistance of these organisms to chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* **31**, 731–737.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. P. och Schliefer, K. H. 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 251–264.
- Wood, P. M. 1986. Nitrification as a bacterial energy source. I: *Nitrification*, J. I. Prosser (Red.), s. 39–62, IRL Press: Aberdeen.
- Yuan, Z. och Blackall, L. L. 2002. Sludge population optimisation: a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems. *Water Research* **13**, 482–490.



Box 47607 117 94 Stockholm

Tfn 08-506 002 00

Fax 08-506 002 10

E-post svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se