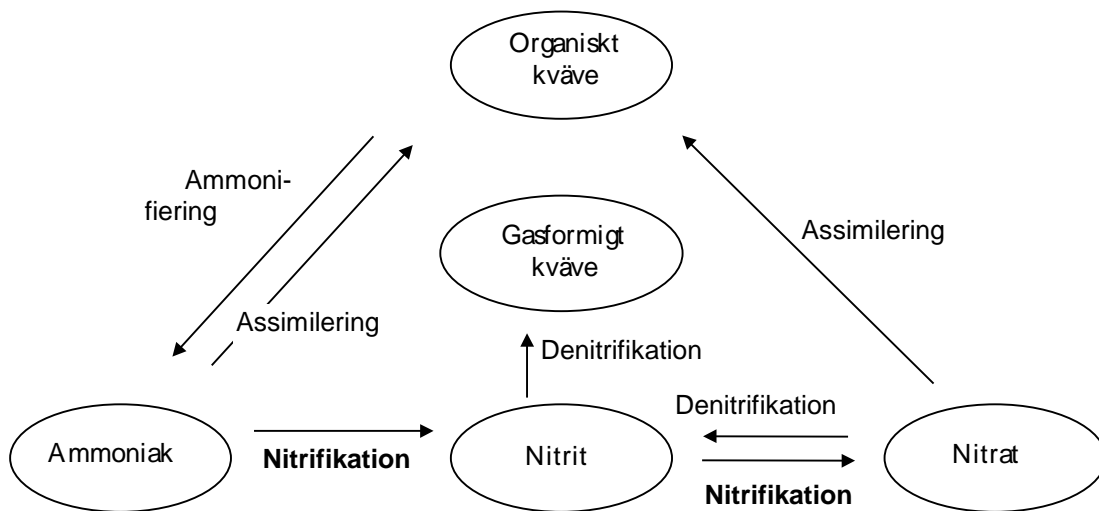




rapport

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Effektstyrd fraktionering och identifiering av nitrifikationshämmande ämnen i avloppsvatten



Anders Svenson, Björn Sandén, Gunnel Dalhammar, Mikael Remberger och Lennart Kaj
B 1362
Stockholm, mars 2000



Organisation/Organization IVL Svenska Miljöinstitutet AB IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd.	RAPPORTSAMMANFATTNING Report Summary
Adress/address Box 21060 100 31 Stockholm	Projekttitel/Project title
Telefonnr/Telephone 08-587 563 00	Anslagsgivare för projektet/ Project sponsor VA-Forsk, enskilda företag och kommuner
Rapportförfattare/author Anders Svenson, Björn Sandén, Gunnel Dalhammar, Mikael Remberger och Lennart Kaj	
Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report Effektstyrd fraktionering och identifiering av nitrifikationshämmande ämnen i avloppsvatten	
Sammanfattning/Summary Restriktioner i utsläpp av kväve vid rening av kommunalt avloppsvatten har lett till en utbyggnad av reningsverk för att reducera kväveutsläppen. Metodiken bygger på mikrobiella processer som ibland störs av ämnen som förekommer i avloppsvattnet. Denna rapport beskriver en metodik att spåra och identifiera ämnen som hämmar kvävereduktionen. Vattenprov innehållande hämmande ämnen fraktioneras och i fraktionerna spåras dessa ämnen med test av hämning av nitritoxidation med en renkultur av <i>Nitrobacter</i> . Ämnen i toxiska fraktioner identifieras. Med denna metodik har några omättade fettsyror och två monoterpener påvisats svara för huvuddelen av den hämmande effekten i ett avloppsvatten.	
Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område eller näringsgren /Keywords Nitrifikationshämmning, kvävereduktion, <i>Nitrobacter</i> , fraktionering, Toxicity identification evaluation, TIE, avloppsvatten	
Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data IVL Rapport/report B 1362	
Beställningsadress för rapporten/Ordering address IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm fax: 08-598 563 90, e-mail: publicationservice@ivl.se	

Innehållsförteckning

Sammanfattning	2
Summary	2
1. Inledning, bakgrund.....	3
2 Material och metoder.....	4
2.1 Vattenprover	4
2.2 Nitrifikationstest	4
2.2.1 Inhibitionstest, bestämning av EC-värden	4
2.2.2 Test av fraktioner av prov	5
2.3 Primärkaraktisering.....	5
2.4 Grovfraktionering	5
2.5 Högupplösande fraktionering.....	5
2.6 Identifiering.....	6
2.7 Metallanalyser.....	6
2.8 Övriga analyser	6
3 Resultat och diskussion	6
3.1 Nitrifikationshämning i avloppsvattenprover	6
3.2 Primärkaraktisering.....	8
3.2.1 Prov 1	8
3.2.2 Prov 2	9
3.2.3 Prov 3	10
3.3 Grovfraktionering	10
3.3.1 Prov 1	10
3.3.2 Prov 2	11
3.4 Högupplösande separation av fraktioner av Prov 1	13
3.5 Identifiering av toxiska kandidater i Prov 1.....	14
3.6 Materialbalans för nitrifikationshämmande ämnen.	16
3.6.1 Prov 1	16
3.6.2 Prov 2	18
4 Slutsatser och kommentarer.....	20
5 Tillkännagivanden	21
6 Referenser	21

Sammanfattning

Restriktioner i utsläpp av kväve vid rening av kommunalt avloppsvatten har lett till en utbyggnad av reningsverk för att reducera kväveutsläppen. Metodiken bygger på mikrobiella processer som ibland störs av ämnen som förekommer i avloppsvattnet. Denna rapport beskriver en metodik att spåra och identifiera ämnen som hämmar kvävereduktionen. Vattenprov innehållande hämmande ämnen fraktioneras och i fraktionerna spåras dessa ämnen med test av hämning av nitritoxidation med en renkultur av *Nitrobacter*. Ämnen i toxiska fraktioner identifieras. Med denna metodik har några omättade fettsyror och två monoterpener påvisats svara för den hämmande effekten i ett industriellt processvatten. I ett kommunalt avloppsvatten har hämmande substanser lokaliserats till en fraktion med i vatten lösliga organiska eller oorganiska ämnen.

Summary

In order to reduce the contents of nitrogen in treated wastewater, microbial processes conducting nitrification of nitrogenous compounds and denitrification to gaseous nitrogen are included in wastewater treatment processes. A set of compounds has been found inhibitory to these microorganisms. A procedure is presented for identification of nitrification inhibitors in wastewaters. This includes fractionation of the wastewater sample and location of the inhibitory effect using a nitrification inhibition assay where pure cultures of *Nitrobacter* are used.

A series of unsaturated fatty acids and two monoterpenes were found to constitute most of the inhibitory effect in a wastewater sample.

1. Inledning, bakgrund

Vidsträckta områden av syrefria bottenar och ofta förekommande algblooming är följer av utsläpp av närsalter som kväve och fosfor samt organiskt material. I vissa recipientmiljöer är utsläpp av kväve begränsande för denna eutrofiering. Såväl kommunala som industriella utsläpp bidrar med utsläpp av kväve till svenska kustområden. Under de senaste åren har ett ökande antal reningsverk infört en mer effektiv kvävereduktion med mikrobiella nitrifikations- och denitrifikationsprocesser. Nitrifikationen ombesörjs av ett litet antal kemolitotrofa bakterier som oxiderar reducerade former av kväveföreningar (Bock m. fl. 1986). Oxidationen genererar endast litet energi, vilket medför en mycket långsam tillväxt av bakterierna. Det är välkänt att nitrifierande och denitrifierande bakterier lätt påverkas av faktorer i omgivningen som temperatur, pH och syrehalt (Barnes och Bliss 1983). Trots att dessa faktorer har optimerats och att en ansenlig bakteriepopulation använts kan även låga halter av vissa ämnen störa processerna. Under sådana förhållanden klarar inte mikroorganismerna att oxidera alla kväveföreningar utan en stor andel kommer att passera ut i recipienten.

Vissa ämnen är redan kända nitrifikationshämmare (Sharma och Ahlert 1976). En översikt av ämnen som hämmar ammoniakoxidation och nitritoxidation har tidigare rapporterats (Naturvårdsverket 1990). Vid driftstörningar i kvävereningen söker man vanligen efter kända hämmande ämnen till någon av nitrifikationsprocesserna, men sannolikheten är ännu relativt hög att andra ämnen, som ännu inte påvisats som nitrifikationshämmare, kan förekomma i ett avloppsvatten. För ungefär tio år sedan utvecklades metodik för identifiering av toxiska ämnen enligt en princip, där ett test användes för att spåra och lokalisera toxiciteten under fraktionering av toxiska prov t. ex. avloppsvatten. Metodik benämns Toxicity Identification Evaluation, och är även känd under akronymen TIE (Mount och Anderson-Carnahan 1988 a, b; Mount 1989; Burkhard och Ankley 1989). Först tillämpades principen med toxicitet i kräftdjurstest och test av fisktoxicitet som biotest (Mount 1989; Burkhard och Ankley 1989; Norberg-King m. fl. 1991) och senare har flera andra biotester framgångsrikt prövats, bl. a. har metodik utnyttjande Microtox-test utvecklats vid IVL (Svenson m. fl. 1992, 1996).

Genom att använda den nitritoxiderande bakterien *Nitrobacter* som testorganism vill vi beskriva metodik att ta reda på vilka ämnen som stör nitrifikationen i prov av avloppsvatten. *Nitrobacter* är en av de organismer som påverkas av störande ämnen i ett avloppsvatten. Delar av resultaten har rapporterats på en konferens om ekotoxikologi i oktober 1999 (Svenson m. fl. 1999) och har också ingått i en akademisk avhandling (Sandén 1999).

2 Material och metoder

2.1 Vattenprover

Prov av kondensatvatten från en mellansvensk anläggning för torkning av biobränsle togs 1998-06-26 (Prov 1). Provet förvarades vid -20°C före analys och test. Prov av avloppsvatten från Öresundsverket, Helsingborg, togs 1998-11-17, infrysades och sändes till IVL, där provet förvarades fryst före analyser och tester (Prov 2). Ett processvattenprov innehållande neutraliserad lut från en kemiindustri i södra Sverige insamlades i augusti 1998 och levererades fryst till laboratoriet (Prov 3).

2.2 Nitrifikationstest

2.2.1 Inhibitionstest, bestämning av EC-värden

Nitrobacter från en aktivt slamanläggning i Stockholm användes i testen. Cellerna odlades i en fermentor till en koncentration av $4 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (Grunditz och Dalhammar, 1999). Odlingsmediets sammansättning finns beskriven i Soriano och Walker (1973). Metodiken baseras på ett nitrifikationshämningstest som beskrivits av Grunditz, med mindre modifieringar. Prov löstes, om det visade sig nödvändigt, i ett lämpligt lösningsmedel och späddes till 1,5 mL. Lösningen överfördes till ett 10 mL skruvlocks rör. NaNO_2 löstes i cellsuspensionen i en koncentration av 35 mg N/L och 1,5 mL av denna suspension tillfördes till varje rör. Totala volymen blev därmed 3 mL och pH justerades till 7,8. Rören inkuberades horisontellt och vändes sakta i ett termostaterat skakbord/vattenbad vid 30°C i 4 h. Varje timme togs 5 μL prov av testsuspensionen och tillfördes en brunn i en mikrotiterplatta. Ett nitritreagens, 0,3 mL Merck Spectroquant löst i vatten, tillfördes omedelbart och nitritkoncentrationer bestämdes fotometriskt. Varje testserie innehöll kontroller och referenser med vatten, cellsuspension och nitrit. Den linjära förbrukningen av nitrit i prov jämfördes med referenser. Hämningen beräknades enligt:

$$\% \text{ Hämning} = (1 - v_{\text{prov}} / v_{\text{ref}}) \times 100$$

där v_{ref} är nitritförbrukning i referensen och v_{prov} är nitritförbrukning i provet. EC_{20} och EC_{50} beräknades ur linjära anpassningar till doskurvor med procentuell hämning avsatt mot logaritmen för koncentrationer, där test av minst fyra koncentrationer ingått.

2.2.2 Test av fraktioner av prov

Test av separerade fraktioner utfördes i enkoncentrationstest. Hämmade effekter på nitritoxidation mättes enligt ovan och en effektkvot beräknades enligt:

$$\text{Effektkvot} = v_{\text{ref}}/v_{\text{prov}} - 1$$

Detta effektmått användes, tillsammans med procentuell hämning, för att utvärdera såväl primärkaraktärisering som effekter i separerade fraktioner av prov.

2.3 Primärkaraktärisering

Primärkaraktärisering av grundläggande fysikaliska och kemiska egenskaper hos dominerande hämmade ämnen utfördes genom test med *Nitrobacter* före och efter olika förbehandlingsmetoder av prov enligt en tidigare beskrivning (Svenson m. fl. 1992).

2.4 Grovfraktionering

Vattenprov (500 mL) justerades till pH 3 med utspädd saltsyra och applicerades på en 10 g kolonn innehållande oktadecyl (C₁₈) substituerad kiselgel (Varian Mega Bond Elut). Kolonnen tvättades med 1 mM saltsyra, pH 3. Adsorberade ämnen eluerades stegvis med metanol/vattenlösningar med ökande halt metanol (25-100 %). Fraktioner med ej sorberade ämnen, tvättlösningen och metanolfraktionerna testades i nitrifikationshämningstestet enligt ovan. Högsta metanolhalten i testmediet var 1,5 %.

2.5 Högupplösande fraktionering

HPLC användes för högupplösande separation av fraktioner med hämmade effekt i grovfraktioneringen. I utrustningen ingick en gradientpump, Consta Metric 4100 (Thermo Separation Products), en 250 x 4,6 mm i. d. kolonn innehållande Supelcosil LC-18, 5 µm partikelstorlek och en UV-detektor (SM 4000, LDC/Milton Roy). Provet (500 µL) applicerades i en metanolösning med ca 20 % lägre metanolhalt än den där prov eluerats i grovfraktioneringen. Kolonnen eluerades med en mobil fas av olika proportioner 5 mM natriumfosfat, pH 3,0 och metanol enligt följande: 0-5 min med 5 %-enheter lägre metanolhalt än i grovfraktioneringen, vid 5-10 min ökande metanolhalt till nivån vid grovfraktioneringen, vid 10-20 min isokratisk eluering vid denna haltnivå, från 20-25 min med en ökande halt metanol till 100 %, och slutligen från 25-40 min med 100 % metanol. Eluatets UV-absorption mättes vid 230 nm. Flödes hastigheten var 1 mL/min och fraktioner om 1 mL uppsamlades för test i nitrifikationshämningstest och vidare analyser.

2.6 Identifiering

Fraktioner med hämmande effekter extraherades och analyserades med gaskromatografi - masspektrometri (GC-MS) i en HP 5890 (Hewlett Packard), Trio 2 (Micromass) enligt metodik som beskrivits tidigare (Svenson m. fl. 1996). Neutrala ämnen undersöktes direkt och organiska syror efter metylförestring med diazometan. För en fullständig identifiering fordrades tillgång till autentiska referenssubstanser.

Avdrivningsbara organiska ämnen analyserades med en purge-and-trap injektor (CP 4010, Chrompack) kopplad till GC-MS. Prov genomflödades med 20 mL/min He vid 22°C i 10 min. Kylfällans temperatur var -110°C. Injektion åstadkoms genom att höja temperaturen till 200°C. GC-kolonnen (VA-5MS 30 m x 0,25 mm, filmtjocklek 0,25 µm, Varian) hölls vid 50°C i 7 min och programmerades därefter med 15 °C/min till 250°C. Masspektrometern användes i EI+-mod och fragment från m/e 40 till 400 registrerades.

2.7 Metallanalyser

Multielementanalys av metaller utfördes med ICP av SGAB Analytica Luleå. 20 mL prov behandlades med 2 mL HNO₃ i mikrovågsugn. Olika metaller analyserades därefter med plasma-masspektrometri, plasma-emissionspektrometri och atomfluorescens.

2.8 Övriga analyser

Totalt organiskt kol analyserades enligt standardmetoden SS 028199, Astro 2001. Analyser av vissa oorganiska anjoner (fluorid, klorid, bromid, nitrat, fosfat, sulfat och tiosulfat) utfördes med jonkromatografi av Mikro Kemi AB, Uppsala. De analyserade (gaskromatografiskt) också myrsyra, ättiksyra och propionsyra. Totalhalt cyanid och fri cyanid analyserades fotometriskt (NEN-6655) av SGAB Analytica, Täby.

Fettsyror och hartssyror analyserades gaskromatografiskt efter extraktion av vattenprov (Prov 1) och derivatisering. Monoterpener kvantifierades med GC-MS med purge-and-trap injektor enligt 2.6.

3 Resultat och diskussion

3.1 Nitrifikationshämning i avloppsvattenprover

Vid tillämpning av hämningstest med *Nitrobacter*, som utvecklats av Grunditz och Dalhammar (1999), i TIE-proceduren var det nödvändigt att modifiera metoden något.

Testvolymen minskades och nitritanalysen förenklades genom användningen av mikrotiterplattor och plattläsare. Sammantaget gav ändringarna möjlighet till test av ett större antal prover samtidigt.

I samråd med kontaktpersoner på industrier och reningsverk valdes tre avloppsvattenprover för undersökningarna. Provernas hämning av nitrifikation testades inledningsvis. Fig. 1 och 2 visar doskurvor för två av vattenproven (Prov 1 och 2). Ur dessa kurvor beräknades EC_{50} och EC_{20} för hämningen och resultaten ges i Tabell 1. Kondensatet var starkt hämmande i nitrifikationstestet. EC_{50} och EC_{20} uppmättes till 0,88 respektive 0,59 % inspädning.

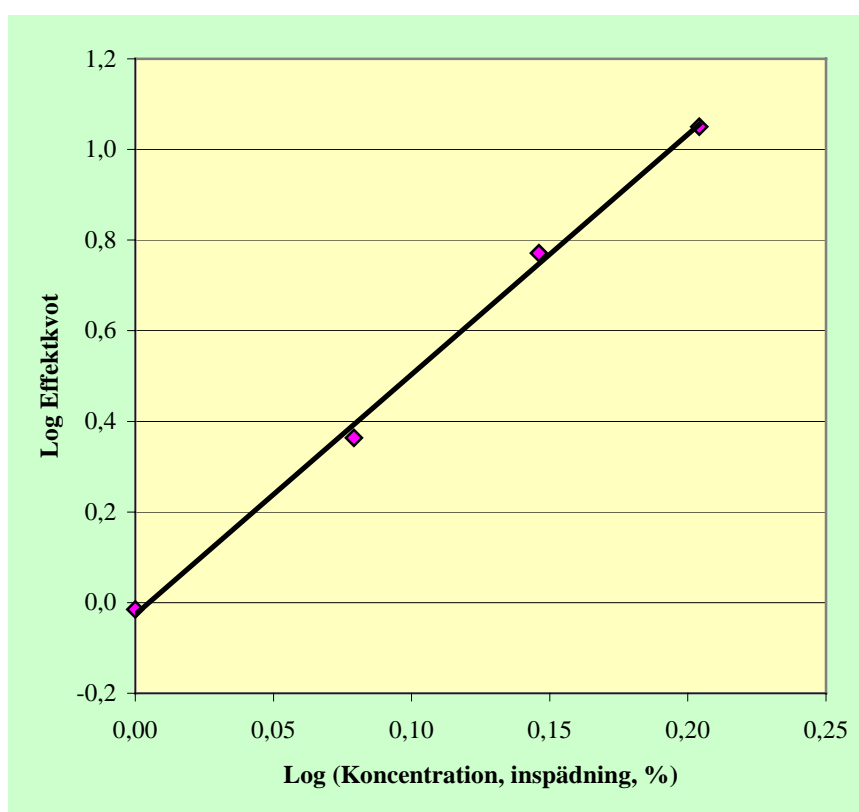


Fig. 1. Test av nitrifikationshämning med *Nitrobacter* i ett kondensatavlopp, Prov 1.

Det undersökta kommunala avloppsvattnet hade en lägre hämmande effekt på nitritoxidationen, EC_{50} och EC_{20} vid 42 resp. 25 % inblandning av vattenprov i testmediet. Effekten var relativt låg vid jämförelse med vad som maximalt kan inblandas av prov i testmediet, 50 %. Med hänsyn till att effekten uppmättes i prov av totalt inkommande vatten till ett reningsverk med höga dygnsflöden blir den totala effekten (som produkten av flöde och EC-värde) ansevärt, vilket motiverar att undersöka den kemiska identiteten av vad som orsakat hämningen. Provet av ett industriellt avloppsvatten hämmande nitrifikationen endast litet, så litet att EC_{50} eller EC_{20} inte kunde beräknas.

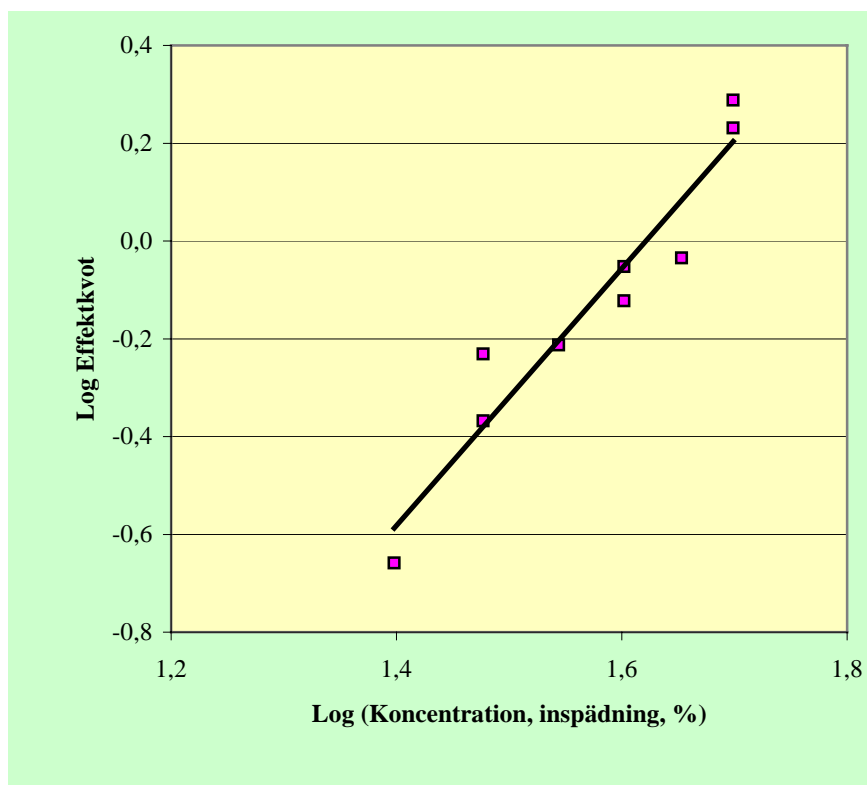


Fig. 2. Test av nitrifikationshämmning med *Nitrobacter* i ett kommunalt avloppsvatten, Prov 2.

Tabell 1 Nitrifikationshämmning i tre avloppsvattenprover

Prov		Nitrifikationshämmning	
		EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)
1	Kondensat	0,59	0,88
2	Kommunalt avlopp	25	42
3	Industriavlopp	>50	>50

3.2 Primärkaraktisering

3.2.1 Prov 1

Primärkaraktisering av Prov 1 visade flera utmärkande egenskaper hos dominerande hämmande ämnen (se Tabell 2). Mest utmärkande egenskap var ämnens lipofilitet dvs. tendens till fettlöslighet. I sur och neutral miljö ledde förbehandlingen (med C₁₈-kolonn)

till helt utebliven hämning. Vid samma behandling i alkali återstod endast en liten hämmande effekt. Hämmande ämnen var uppenbarligen också lättflyktiga, vilket kunde förväntas med kännedom om provets ursprung. Kvävgasgenomströmning eliminerade en stor del av den hämmande effekten. Behandling med katjon- och anjonbytarkolonner minskade också den hämmande effekten av Prov 1. Även instabilitet vid förvaring indikerades. Reduktion av eventuella lätt reducerbara funktionella grupper hos de dominerande nitrifikationshämmande ämnen i Prov 1 kunde inte undersökas då reagensen påverkade *Nitrobacter*-testet. Viktigaste egenskapen som nämnts ovan var inhibitorernas lipofilitet, vilken också kan användas i det fortsatta fraktioneringsarbetet.

Tabell 2 Nitrifikationshämning av ett kondensat från biobränsletorkning (Prov 1) efter olika förbehandlingar.

Förbehandling	Relativ nitrifikationshämning (%)	Respons*
Stabilitet, pH 3	51	S
Stabilitet, pH 7	84	NS
Stabilitet, pH 11	143	I
Sorption katjonbytare	30	S
Sorption anjonbytare	35	S
Reduktion, Na-borhydrid	92	NS
N ₂ -genomströmning, pH 3	22	S
N ₂ -genomströmning, pH 7	3	S
N ₂ -genomströmning, pH 11	38	S
Test pH 7.00	78	S
Test pH 7.60	84	NS
Test pH 7.88	100	NS
C ₁₈ sorption, pH 3	0	S
C ₁₈ sorption, pH 7	0	S
C ₁₈ sorption, pH 11	14	S
Obehandlad kontroll	100	
Reduktion, Na-borhydrid, kontroll	0	S

*S = >20 % minskad hämning, NS = inom ±20 % förändring, I = ökad hämning.

3.2.2 Prov 2

Primärkaraktiseringen av Prov 2 visade också några utmärkande egenskaper hos dominerande hämmande ämnen (se Fig. 3). Viktig egenskap var även här lipofiliteten, vilken var mest framträdande vid behandling i neutral miljö. Även behandling i anjonbytare minskade den hämmande effekten av Prov 2. Förekomst av reducerbara grupper hos nitrifikationshämmande ämnen i Prov 2 är osäker eftersom reduktionsmedlet självt stör nitrifikationen. Övriga iakttagelser var osäkra beroende på den betydligt svagare hämmande effekten av Prov 2 i *Nitrobacter*-testet.

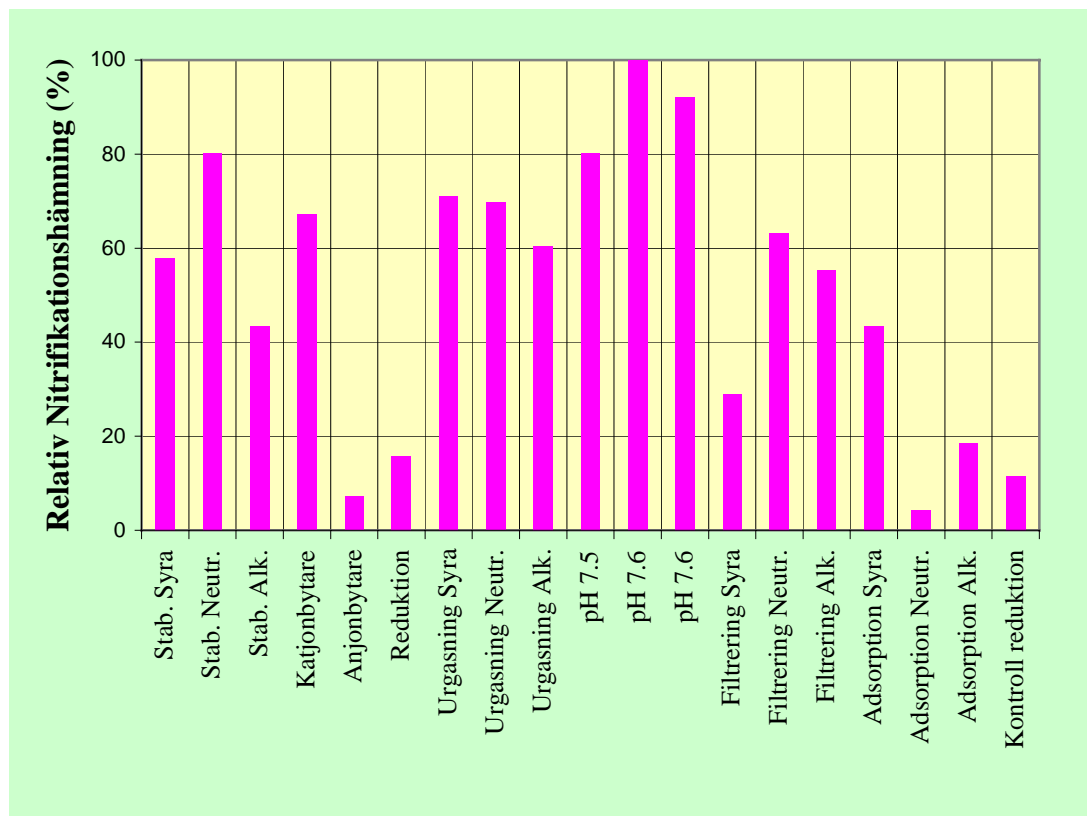


Fig. 3. Primärkaraktärisering av ett kommunalt avloppsvatten (Prov 2) avseende nitrifikationshämning med *Nitrobacter* efter olika förbehandlingsmetoder. Olika nivåer av hämning i relation till test vid pH 7,6 (normaliserat till 100 %).

3.2.3 Prov 3

Någon primärkaraktärisering av Prov 3, ett industriellt avloppsvatten, kunde inte genomföras på grund av dess obetydliga hämmande effekt i *Nitrobacter*-testet.

3.3 Grovfraktionering

3.3.1 Prov 1

Behandling av kondensatet (Prov 1) i en C₁₈-substituerad kiselgelkolonn resulterade i fullständig eliminering av hämningen i provet (Fig. 4). Kolonnen eluerades därefter med en stegvis gradient av metanol/vattenblandningar. Nitrifikationshämningen uppmättes i eluatet med en inspädning av 1,5 % eluat i testmediet. Resultaten visas i Fig. 4.

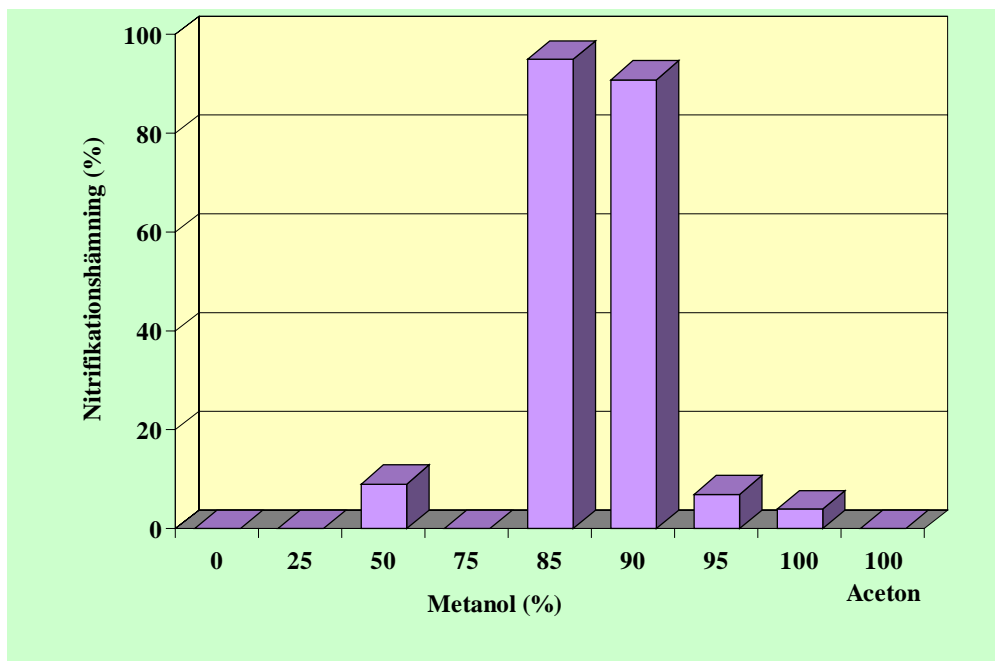


Fig. 4. Fraktionering av kondensat från bibränsletorkning (Prov 1) med SPE på C₁₈-kolonn och test av nitrifikationshämning med *Nitrobacter*. Inspädning av 1,5 % eluat i testmediet.

Två fraktioner som eluerades med 85 and 90 % metanol innehöll huvuddelen av ämnen med hämmande effekter. Dessa båda fraktioner separerades ytterligare med högupp-lösande HPLC, se 3.4.

3.3.2 Prov 2

Lipofila egenskaper hos dominerande toxiska ämnen i Prov 2 enligt primärkaraktäriseringen utnyttjades till att fraktionera provet med C₁₈-substituerad kiselgel. Resultatet visas i Fig. 5 och av denna framgår att huvuddelen av den hämmande effekten kunde återfinnas i eluatet. De lipofila egenskaperna som iaktogs i primärkaraktäriseringen var uppenbarligen otillräckliga för att kunna utnyttjas vid fraktionering i preparativ skala. Osäkerheten vid bedömning av resultat av test i primärkaraktäriseringen är relativt sett större än i test av separerade fraktioner. Detta beror på att de förra testen utfördes vid ursprungliga provets effektnivå som i detta fall var relativt låg. I test av separerade fraktioner har provet uppkoncentrerats. Små och i sammanhanget obetydliga effekter erhöles i andra fraktioner, t. ex. vid eluering med ren metanol.

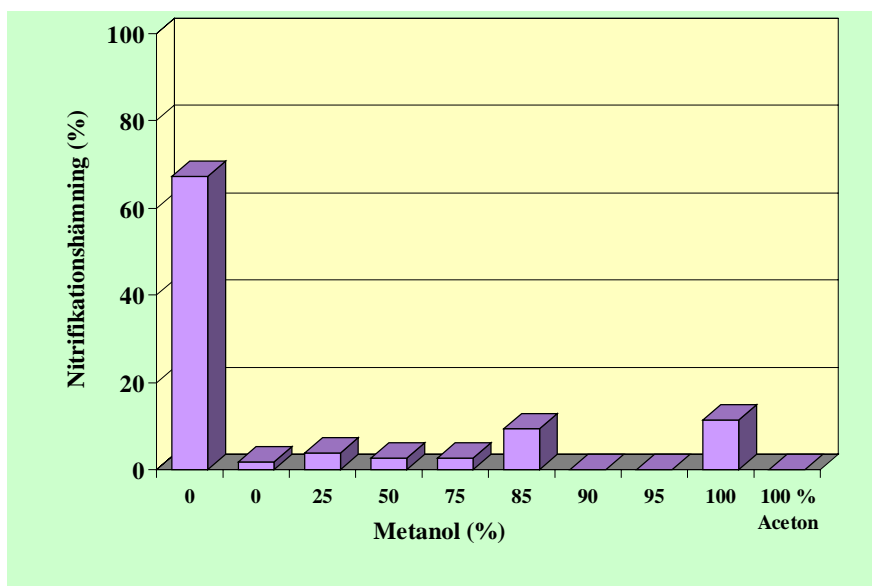


Fig. 5. Fraktionering av kommunalt avloppsvatten (Prov 2) med SPE på C₁₈-kolonn och test av nitrifikationshämmning med *Nitrobacter*. Inspädning av 1,5 % eluat i testmediet.

En del av eluatet från denna behandling innehållande huvuddelen av den hämmande effekten fick efter justering till pH 7 passera en anjonbyttarkolonn (SAX-substituerad kiselgel). Kolonnen tvättades och eluerades med utspädd saltsyra, 10 och 100 mM. Resultatet visas i Fig. 6.

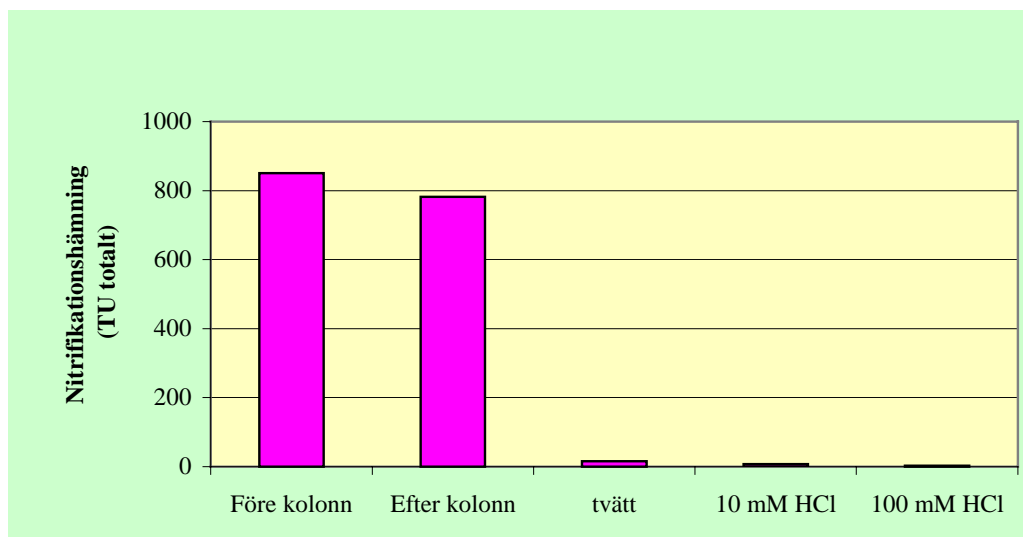


Fig. 6. Fraktionering av en fraktion av kommunalt avloppsvatten på anjonbyttarkolonn och test av nitrifikationshämmning i erhållna fraktioner med *Nitrobacter*. Avloppsvattenprovet hade först passerat C₁₈-kolonn. Effekter beräknade i toxiska enheter (TU) ur effektkvoter enligt 2.2.2 ovan.

Av figuren framgår att hämmande substanser passerade även denna kolonn utan att associeras. Slutsatsen av dessa båda steg är att dominerande hämmande ämnen i Prov 2 varken är lipofila till sin natur eller innehåller anjoniska funktionella grupper, konstateranden som i vissa delar motsägs av primärkaraktiseringen (se Fig. 2). Ytterligare två typer av sorbenter prövades med den nitrifikationshämmande fraktionen (prov efter kolonn i Fig. 6). Propylsulfonat-(PRS)-substituerad kiselgel (stark katjonbytare) och ENV+ bestående av divinylbensen-styren-kopolymer hade heller ingen minskande effekt på nitrifikationshämningen (data ej redovisade). Resultaten tyder på att nitrifikationshämning i detta prov skulle kunna vara oorganiska eller organiska neutrala ämnen som dessutom är lösliga i vatten. Tolkning av mer subtila indikationer i resultaten skulle kunna leda till katjoniska (metalljoner) eller anjoniska oorganiska eller organiska inhibitorer.

3.4 Högupplösande separation av fraktioner av Prov 1

De två fraktioner som enligt Fig. 4 innehöll huvuddelen av den nitrifikationshämmande effekten i kondensatet från biobränsletorkningen fraktionerades med HPLC med C₁₈-substituerad kiselgel som separationsmedium. Hämmande ämnen i den fraktion som eluerats med 85 % metanol eluerades i två fraktioner av eluatet och i fraktionen som eluerats med 90 % metanol återfanns den hämmande effekten huvudsakligen i en fraktion (Fig. 3 a och b). Andra fraktioner innehöll försumbara hämmande effekter.

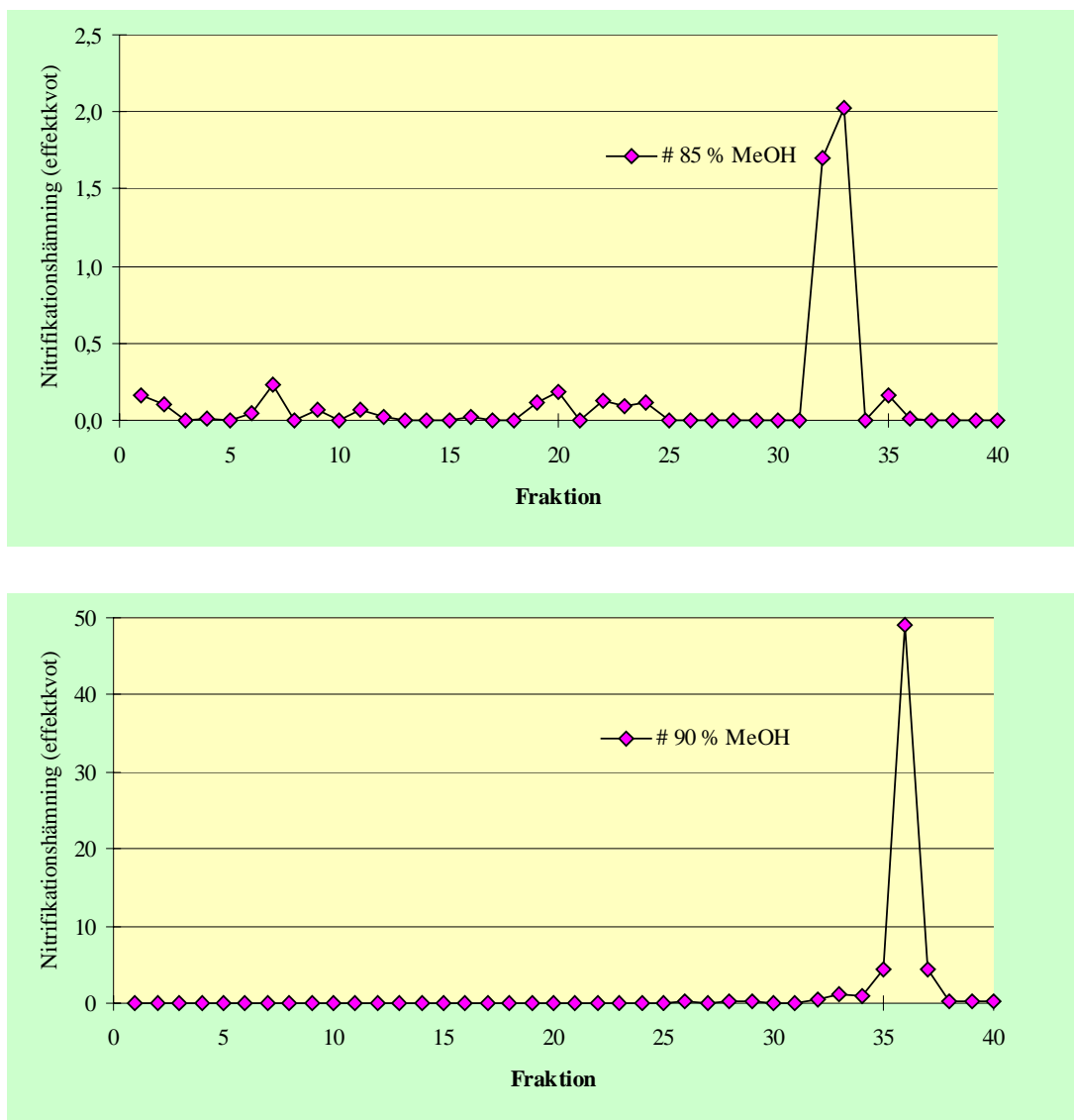
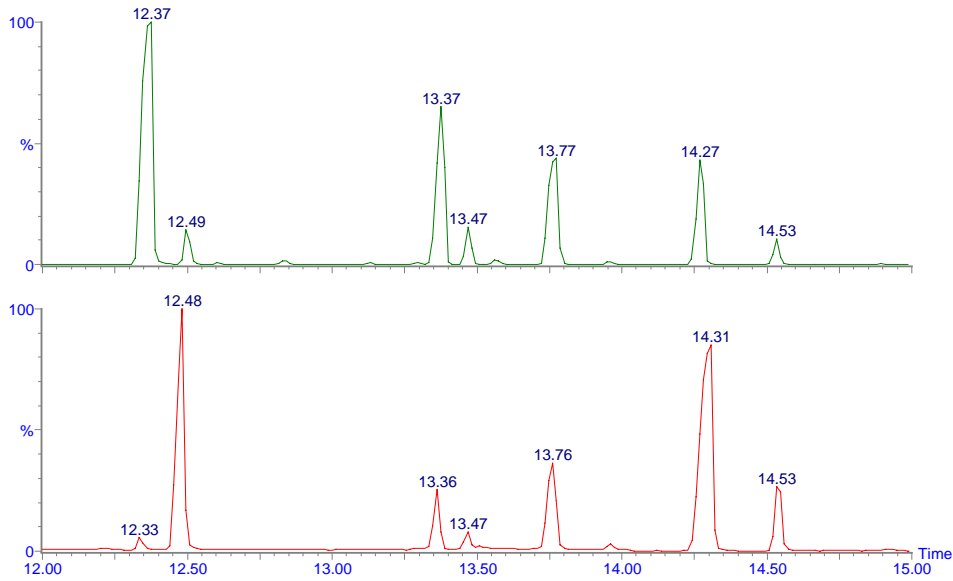


Fig. 7 HPLC fraktionering av två separerade fraktioner av kondensat från biobränsle (Prov 1).

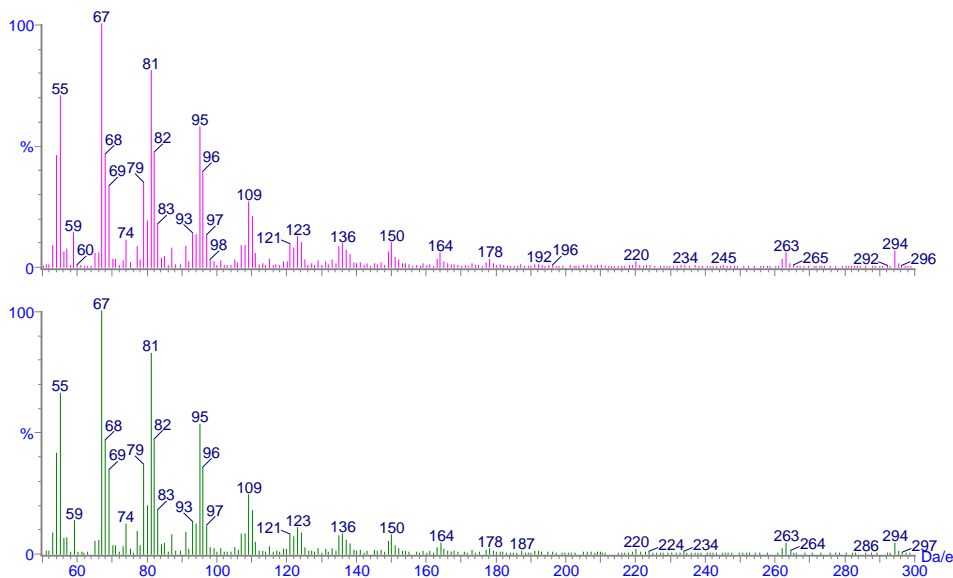
3.5 Identifiering av toxiska kandidater i Prov 1.

Identifiering med GC-MS av såväl oderivatiserade som metylförestrade prov av fraktionerna 32 och 33 i HPLC-separationen av fraktionen som eluerats med 85 % metanol gav ett antal omättade fettsyror och hartssyror som kandidater till nitrifikationshämmare, se Fig. 8 (alla kromatogram ej visade). Kandidaterna identifierades som oljesyra, linsyra, α - och γ -linolensyra, samt hartssyrorna pimar-, palustrin- och abietinsyra. Motsvarande analys av fraktion 36 av 90 %-fraktionen gav oljesyra som dominerande toxisk kandidat (ej visat diagram).



Övre kromatogrammet: # 85:32, metylerad

Undre kromatogrammet: # 85:33, metylerad



Övre masspektret: # 85:33 12,48 min

Undre masspektret: Linolsyra metylester

Fig. 8. GC-MS av fraktioner av Prov 1. Övre figuren GC-kromatogram över fraktionerna 32 och 33 (efter metylering) vid HPLC av grovfraktioneringens fraktion eluerad med 85% metanol. Undre figuren visar masspektret över komponenten med retentionstiden 12,48 min och ett referensspektrum av linolsyra (som metylester).

3.6 Materialbalans för nitrifikationshämmande ämnen.

3.6.1 Prov 1

Halter av identifierade nitrifikationshämmande ämnen i Prov 1 analyserades i ursprungsprovet och resultaten ges i Tabell 3. Halter av vissa ämnen med ursprung i ved var jämförelsevis höga och vissa fall överskridande vattenlösligheten. Specifika effekter i nitrifikationshämningstest uppmättes för de identifierade toxiska kandidaterna (Tabell 3). Med utgångspunkt i dessa värden beräknades bidrag från enskilda ämnen.

Primärkaraktiseringen antydde hämmande effekter av flyktiga föreningar. Eventuella förluster av nitrifikationshämmande ämnen undersöktes därför med GC-MS försedd med en purge/trapinjektor för analys av flyktiga ämnen. Ett antal monoterpenier identifierades med denna teknik: 3-carenen, α -pinen, limonen och en grupp mindre komponenter i samma ämnesklass. De tre terpenier med högsta halterna undersöktes i inhibitions-testet och resultat av analyser och tester utvärderade som bidrag till provets totala effekt ges i Tabell 3.

Linolsyra var den viktigaste nitrifikationshämmande ämnet i detta vattenprov (se Fig. 9) och svarade för 59 % av hämningen. Tre andra omättade fettsyror svarade för tillsammans 28 %, medan hartssyrorna svarade för ca 1 % av totala effekten. Av Fig. 9 och Tabell 2 framgår att dessa bidrag om man antar full additivitet tillsammans uppgick till 87 % av provets totala effekt och att monoterpenerna 3-carenen och α -pinen bidrog till ca 13 % av hämningen i provet och således tillsammans med fettsyrorna skulle förklara hela den nitrifikationshämmande effekten av Prov 1.

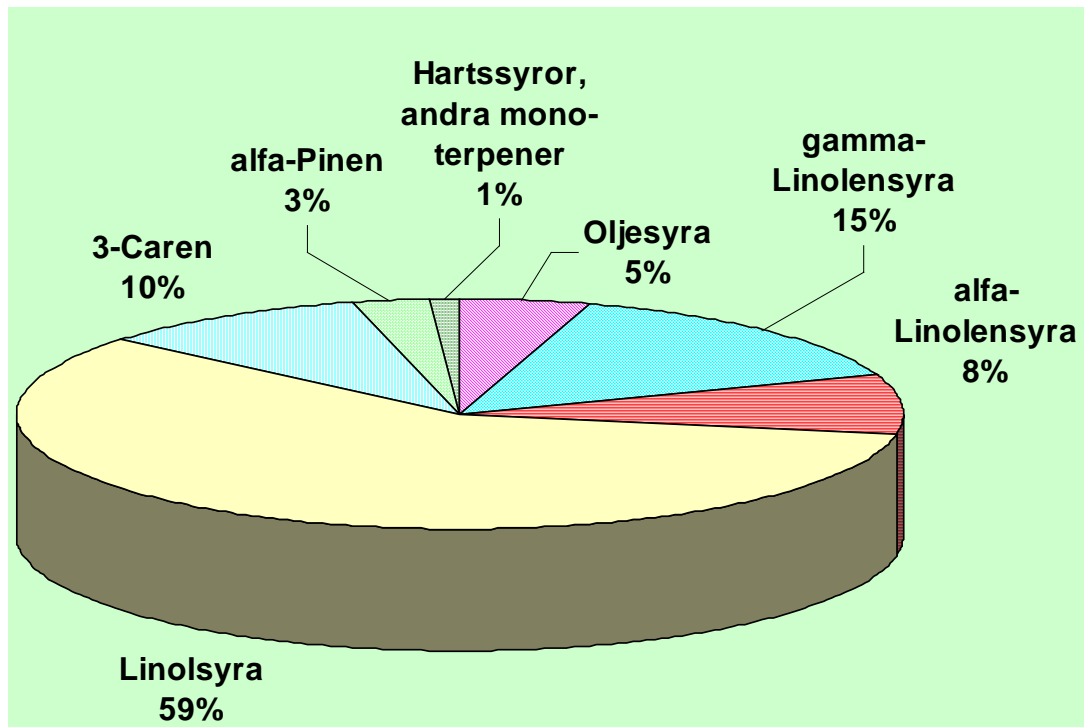


Fig. 9 Ämnen som hämmar nitrifikationen i test med *Nitrobacter* i ett biobränslekondensat (Prov 1) och deras bidrag till hämningen.

Överensstämmelsen antyder att substansernas bidrag skulle vara helt additiva. För att pröva detta testades en syntetisk blandning av de sex viktigaste hämmande substanserna vid de proportioner av halter som förelåg i ursprungsprovet. Testet av den syntetiska blandningen gav ett EC_{50} av 1,06 % att jämföra med ursprungsprovets 0,88 %. Skillnaden var som synes liten men om den vore signifikant (kan ej prövas då ej tillräckligt antal replikat testats) skulle den kunna bero av förutom ej full additivitet, att någon mindre hämmande komponent ej ingick i den syntetiska blandningen eller enbart förklaras av skillnader i biotillgänglighet i prov respektive syntetisk blandning. Det får anses klart att det är linolsyra, oljesyra, två linolensyror samt tre monoterpener som svarar för den helt dominerande nitrifikationshämmande effekten i Prov 1. Att inte åtgärda förekomsten av dessa ämnen i detta kondensatavlopp skulle medföra fortsatt hämning av de mikrobiella kväverenningsprocesserna.

Tabell 3 Identifierade nitrifikationshämmande ämnen i Prov 1 (kondensat) och deras bidrag till den hämmande effekten.

Toxisk kandidat	Konc. i Prov 1 (mg/L)	EC ₂₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	Effektbidrag
Palustrinsyra	64	9,36	28,4	0,01
Pimarsyra	48		150	0,00
Oljesyra	140	2,08	3,25	0,05
Abietinsyra	380	101	130	0,00
α -Linolensyra	69	0,93	2,97	0,15
γ -Linolensyra	4,9	1,39	5,94	0,08
Linolsyra	160	1,12	1,59	0,59
3-Caren	110	1,98	5,67	0,10
α -Pinen	120	2,80	5,30	0,03
Limonen	6,0	6,2	9,1	0,00
Andra monoterpener	45	2,80*	5,30*	0,00
Summa	600			1,00

* Toxicitetsdata för α -pinen användes i beräkningar av effekter av övriga monoterpener.

3.6.2 Prov 2

Resultaten av analyser och tester av det kommunala avloppsvatten (Prov 2) som ingått i undersökningen visade att nitrifikationshämmare i detta prov hade otillräckliga lipofila egenskaper för att dessa skulle kunna utnyttjas till vidare fraktionering. Ej heller innehöll dessa ämnen anjoner (eller katjoner) som också hade kunnat utnyttjas. Avsaknad av dessa egenskaper begränsar antalet ämnesgrupper som nitrifikationshämmare i detta prov skulle kunna tillhöra. Som nämnts under 3.3.2 var det motiverat att analysera halt av organiskt kol, metaller, oorganiska anjoner, och exempelvis organiska lågmolekylära syror. Resultaten av dessa analyser ges i Tabell 4.

Tabell 4. Kemisk analys av vissa ämnen i kommunalt avloppsvattenprov (Prov 2).

Ämne	Koncentration i fraktion av Prov 2*	Nitrifikationshämmning**	Effektbidrag
Organiskt kol (TOC) mg/L	68		
Myrsyra, µg/L	1,6		
Ättiksyra, µg/L	<1,1		
Propionsyra, µg/L	<1,0		
Metaller			
Arsenik, µg As/L	<4,50	32000	0,00
Kadmium, µg Cd/L	0,300	5000	0,00
Krom, µg Cr/L	2,34	1000	0,00
Koppar, µg Cu/L	17,4	e.t.***	
Kvicksilver, µg Hg/L	<0,0200	1000	0,00
Mangan, µg Mn/L	170	e.t.	
Nickel, µg Ni/L	10,2	1000	0,00
Bly, µg Pb/L	1,47	500	0,00
Zink, µg Zn/L	22,8	10000	0,00
Natrium, µg Na/L	168000	e.t.	
Kalcium, µg Ca/L	57,9	e.t.	
Magnesium, µg Mg/L	16,0	e.t.	
Kalium, µg K/L	20,6	e.t.	
Magnesium, µg Mg/L	16	e.t.	
Oorganiska anjoner, mm.			
Fluorid, mg F/L	<0,5		
Bromid, mg Br/L	<2		
Klorid, mg Cl/L	272		
Fosfat, mg PO ₄ /L	4,7		
Nitrat, mg NO ₃ /L	<2		
Sulfat, mg SO ₄ /L	110		
Tiosulfat, mg S ₂ O ₃ /L	<6,8		
Svavel, mg S/L	35,5		
Cyanid, fri, µg CN/L	25	Se Tabell 5	
Cyanid, total, µg CN/L	31	Se Tabell 5	

* Fraktion som passerat anjonkolonn (och C₁₈- kolonn)

** Lägsta halt vid uppmätt hämning, tröskelvärde (Naturvårdsverket 1990).

*** e.t. = uppgift ej tillgänglig

Ingen av kända nitrifikationshämmande ämnen av de som redovisats i Tabell 4 förelåg i sådana halter i fraktionen att den iakttaga effekten skulle kunna förklaras. Tiosulfat, som bl. a. i egna test visade hämmande effekter, kunde inte påvisas i halter över analysmetodens detektionsgräns. Förekomst av cyanid i Prov 2 uppmättes och cyanidens specifika nitrifikationshämning testades. Resultaten av test och beräkningar ges i Tabell 5. Såväl fri som totalhalt av cyanid bestämdes. Den nitrifikationshämmande effekten av cyanid på *Nitrobacter* uppgick till 69,7 µg CN/L (som EC₅₀) vilket relativt väl överensstämde med ett värde, 86,8 µg/L, som kunde beräknas ur data i litteraturen (Naturvårdsverket 1990). Cyanid kunde dock inte svara för nitrifikationshämningen i Prov 2. Bidraget uppgick till endast 0,06-0,14 % av den totala effekten i det prov som passerat anjonkolonnen.

Tabell 5 Materialbalans för Prov 2 (bidrag från cyanid).

Ämne	Halt i prov (µg/L)	Nitrifikationshämning av cyanid			Beräknad halt vid provets EC-50 µg CN/L	Effekt- bidrag
		EC-50 (µg/L)	EC-20 (µg/L)	Doskurvas lutning		
Cyanid (fri)	25	69,7	48,9	3,91	10,5	0,0006
Cyanid (total)	31	69,7	48,9	3,91	13,0	0,0014

Myrsyra, ättiksyra och propionsyra förelåg i halter nära eller under analysmetodens detektionsgräns (ca 1 µg/L) och kan knappast förväntas ge nitrifikationshämmande effekter (Tabell 4).

Det är känt sedan tidigare att *Nitrosomonas* är intolerant mot hög salthalt. Provets salt-halt enligt analyser i Tabell 4 uppgick till 0,55 g/L (natriumklorid och natriumsulfat), varav en del natriumklorid tillförts via pH-justeringar av provet (<50 mg/L). *Nitrobacter* är dock enligt tillgängliga uppgifter mer tolerant mot salt. Ingen hämning erhöles i test vid 10 g natriumklorid/L eller av sulfathalter upp till 500 mg/L, varför salthalten knappast kan utgöra hämningsorsaken i Prov 2 (Grunditz 1999, Richardson 1985). Primärkaraktäriseringen ger heller inget stöd för att toxiciteten enbart skulle bero av en salteffekt.

4 Slutsatser och kommentarer

Hämningstest med *Nitrobacter* kunde efter viss modifiering användas till att spåra och identifiera nitrifikationshämmande ämnen.

Med TIE-metodik kunde hämmande substanser spåras och identifieras i ett av proven. Omättade fettsyror, främst linolsyra, oljesyra och två former av linolensyra samt vissa

monoterpener var nitrifikationshämmande vid relativt låga halter i vatten. Hämmade effekter i kondensat från biobränsletorkning dominerades av dessa ämnen.

I ett annat prov kunde endast nitrifikationshämmande substanser spåras och viktigare egenskaper anges, men identiteten av hämmande ämnen i provet kunde inte bestämmas. Trots indikationer vid primärkaraktiseringen, framgick det av senare iakttagelser att hämmande ämnen inte dominerades av lipofila egenskaper. Det tredje provet hade alltför låg nivå av hämning för att kunna undersökas. Undersökningarna har visat att TIE-metodik fungerar vid identifiering av organiska lipofila ämnen under förutsättning att en stabil toxisk effekt föreligger, medan metodiken för vattenprover med mer hydrofila hämmande ämnen behöver utvecklas ytterligare.

Att testa med *Nitrobacter* och spåra substanser som hämmar i detta steg täcker inte in all möjlig störning i kväverenningsprocessen. Andra viktiga steg som ammoniakoxidation och reduktionen av nitrat och nitrit kan också störas. Tidigare studier har dock visat att en viss korrelation mellan hämmande effekter på ammoniakoxidation och nitritoxidation (med *Nitrobacter*) föreligger (Jönsson m. fl. 2000). Nitritoxidationen med *Nitrobacter* är generellt sett inte mindre känsligt än andra steg i kvävereningen. En undersökning visar tvärtom att test av detta steg är känsligare än två andra processer i kvävet omvandling (Grunditz m. fl. 1998). Mot enskilda ämnen och sammansatta prover som avloppsvatten kan endera av ammoniakoxidationen eller nitritoxidationen vara mest störningskänslig. Det är dock möjligt att genom likheter i störningsmönster söka hämmande ämnen på kvävereningen via effekter i test med *Nitrobacter*, men för en specifik undersökning av hämning t. ex. i ammoniakoxidationen eller i reduktionen från nitrat till elementärt kväve måste motsvarande metodik utarbetas för dessa processer.

5 Tillkännagivanden

Finansiellt stöd till projektet har erhållits från VA-Forsk (No 97-139), IVLs utvecklingsfond, Helsingborgs stad, m. fl.

6 Referenser

- Barnes, D. och Bliss, P. J. (1983) *Biological control of nitrogen in wastewater treatment*. E. & F. N. Spon Ltd, London, UK.
- Bock, E., Koops, H-P. och Harms, H. (1986) Cell biology of nitrifying bacteria. In: *Nitrification*. Ed., Prosser, J. I., Special publications of the Society for General Microbiology. Vol. 20, Chapter 2, IRL Press Oxford, Washington DC, USA, pp. 17-38.
- Burkhard, L.P. och Ankley, G.T. (1989) Identifying toxicants: NETAC's toxicity-based approach. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 1438-1443.

- Grunditz, C. (1999) Bioassays for the determination of nitrification inhibition. KTH, Stockholm, doktorsavhandling.
- Grunditz, C. och Dalhammar, G. (2000) Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Wat. Res.*, accepted for publication.
- Grunditz, C. Gumaelius, L. och Dalhammar, G. (1998) Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: Application to industrial wastewater. *Wat. Res.* 32, 2995-3000.
- Jönsson, K., Grunditz, C., Dalhammar, G. och La Cour Jansen, J. (2000) Occurrence of nitrification inhibition in Swedish municipal wastewater. Submitted ms.
- Mount, D. och Anderson-Carnahan, L. (1988a) Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase 2. Toxicity identification procedures. US-EPA Report 600/3-88/035.
- Mount, D. och Anderson-Carnahan, L. (1988b) Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase 1. Toxicity characterization procedures. US-EPA Report 600/3-88/034.
- Mount, D.L. (1989) Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase 3. Toxicity confirmation procedures. US-EPA Report 600/3-88/036.
- Naturvårdsverket (1990) Kvävereduktion vid kommunala reningsverk. 6. Nitrifikationshämmande substanser. Litteraturstudie. Naturvårdsverket Rapport 3726.
- Norberg-King, T.J., Durhan, E.J. och Ankley, G.T. (1991) Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa Basin drain, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 891-900.
- Richardson, M. (1985) Nitrification inhibition in the treatment of sewage. Thames Water Authority, Nugent House, Reading, UK.
- Sharma, B. och Ahlert, R. C. (1976) Nitrification and nitrogen removal. *Wat. Res.* 11, 897-925.
- Soriano, S. och Walker, N. (1973) The nitrifying bacteria in soils from Rothamsted classical fields and elsewhere. *J. Appl. Bacteriol.* 36, 523-529.
- Svenson, A., Norin, H. och Hynning, P-Å. (1996) Toxicity directed fractionation of effluents using the bioluminescence of *Vibrio fischeri* and gas chromatographic/mass spectroscopy identification of the toxic compounds. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 11, 277-284.
- Svenson, A., Sandén, B., Dalhammar, G., Remberger, M. och Kaj, L. (1999) Toxicity identification evaluation of nitrification inhibitors in wastewaters. Presented at the 9th Int. Symp. Toxicity Assessment, Pretoria.
- Sandén, B. (1999) Development of an immunosensor for enumeration of *Nitrobacter*. KTH, Stockholm, doktorsavhandling.
- Svenson, A., Zhang, L. och Kaj, L. (1992) Primary chemical and physical characterization of acute toxic components in wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 24, 234-242.

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

IVL är ett oberoende och fristående forskningsinstitut som ägs av staten och näringslivet. Vi erbjuder en helhetssyn, objektivitet och tvärvetenskap för sammansatta miljöfrågor och är en trovärdig partner i miljöarbetet.

IVLs mål är att ta fram vetenskapligt baserade beslutsunderlag åt näringsliv och myndigheter i deras arbete för ett bärkraftigt samhälle.

IVLs affärsidé är att genom forskning och uppdrag snabbt förse samhället med ny kunskap i arbetet för en bättre miljö.

Forsknings- och utvecklingsprojekt publiceras i

IVL Rapport: IVLs publikationsserie (B-serie).

IVL Nyheter: Nyheter om pågående projekt på den nationella och internationella marknaden.

IVL Fakta: Referat av forskningsrapporter och projekt.

IVLs hemsida: www.ivl.se

Forskning och utveckling som publiceras utanför IVLs publikationsserie registreras i IVLs A-serie.

Resultat redovisas även vid seminarier, föreläsningar och konferenser.



IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Box 210 60, SE-100 31 Stockholm
Hälsingegatan 43, Stockholm
Tel: +46 8 598 563 00
Fax: +46 8 598 563 90

IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd

Box 470 86, SE-402 58 Göteborg
Dagjämningsgatan 1, Göteborg
Tel: +46 31 725 62 00
Fax: +46 31 725 62 90

Aneboda, SE-360 30 Lammhult
Aneboda, Lammhult
Tel: +46 472 26 20 75
Fax: +46 472 26 20 04