

Kontrol af skumdannende Mycolata i aktiv-slamanlæg ved dosering af Kemira Water Bulk Control 100



Specialeprojekt udarbejdet af Michelle Lison
Diplomingeniør i Miljøteknik ved Aalborg Universitet,
Sektion for Miljøteknik
Marts 2008

Tema: Kontrol af trådformede bakterier i aktiv-slamanlæg

Projektperiode: 3. september 2007 - 6. marts 2008

Intern vejleder: Per Halkjær Nielsen, professor ved Aalborg Universitet

Ekstern vejleder: Anna-Marie Bøgh, produktchef ved Kemira Water Danmark A/S

Oplagstal: 6

Samlet sidetal: 73

Resume

Mycolata har i de seneste år udgjort et stadigt stigende problem i forbindelse med skumdannelse i aktiv-slam anlæg både i Danmark og i udlandet. Kemira Water A/S er i øjeblikket i færd med at udvikle et nyt produktkoncept kaldet Kemira Water Bulk Control 100 (BC-100), som først og fremmest har til formål at kontrollere Mycolata. BC-100 er i denne forbindelse blevet testet i et fuldskaladoseringsforsøg på Øster Hornum Renseanlæg, hvor produktkonceptet viste sig at have den ønskede effekt: Udbredelsen af Mycolata og skumdannelsen som følge heraf blev reduceret væsentligt på anlægget i løbet af det 10 uger lange doseringsforløb. BC-100 viste sig ligeledes at have en kontrollerende effekt på trådformede bakterier, som ud fra morfologien blev identificeret som Type 0041/0675 (gruppen *Chloroflexi*). Type 0041/0675 forekommer hyppigt i danske renseanlæg, hvor de ofte giver anledning til dårlige bundfældningsegenskaber. Men der findes på nuværende tidspunkt ikke en effektiv kontrolmetode til at bekæmpe dem, så derfor kunne denne iagttagelse være interessant. BC-100 påvirkede dog samtidig flokbakterierne i aktiv-slammet, hvorfor yderligere forsøg må iværksættes for at klarlægge effekten af BC-100 og dermed optimere behandlingen med dette produkt.

En gennemgang af dimensioneringen og driften af Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg viste desuden, at begge anlæg er overdimensionerede i forhold til den aktuelle belastning og drift. Dette giver mulighed for at omlægge driften af anlægget og herved forsøge at kontrollere skumdannende Mycolata gennem processtyring. Ved at forkorte den aerobe slamalder og i stedet skabe længere perioder med anoxiske forhold, vil dette give mindre favorable vækstbetingelser for Mycolata, som derved vil kunne udkonkurreres af andre bakterier i aktiv-slammet.

Abstract (Engelsk resume)

In the last couple of years Mycolata has become an increasing problem when it comes to foaming in activated sludge wastewater treatment plants in both Denmark and other countries. At the moment Kemira Water A/S is developing a new product concept called Kemira Water Bulk Control 100 (BC-100). The purpose of this product is to control Mycolata and thereby reduce problems with foaming. BC-100 has therefore been tested in a full scale survey at Øster Hornum Wastewater Treatment Plant over a period of 10 weeks. The test showed that BC-100 can in fact control Mycolata and reduce foaming in the process tank. It also revealed that BC-100 has an effect on the filaments identified as Type 0041/0675 (*Chloroflexi*). This can be very useful information considering the fact that Type 0041/0675 is one of the most common filaments creating bulking problems in activated sludge wastewater treatment plants in Denmark. Unfortunately the product also had a strong influence on the floc forming bacteria in the sludge. Therefore it is necessary to conduct more experiments that can clarify the effect and efficiency of the product so that the use of BC-100 as a control chemical against problems regarding filaments can be optimized.

An analysis of the designs and processes at both Øster Hornum Wastewater Treatment Plant and Hvilsum Wastewater Treatment Plant showed that both plants have a large unused capacity that can be used for denitrification in the future. This may also help controlling Mycolata.

Forord

Denne rapport udgør et specialeprojekt i forbindelse med uddannelsen som diplomingeniør i miljøteknik ved Aalborg Universitets (AAU) Sektion for Miljøteknik. Rapporten tager udgangspunkt i de problematikker, der vedrører skumdannelse i aktiv-slamanlæg forårsaget af trådformede bakterier tilhørende gruppen Mycolata. Projektets primære formål har været at undersøge og klarlægge effekten af et nyt produktkoncept kaldet Kemira Water Bulk Control 100 (BC-100), som har til hensigt at kontrollere Mycolata i aktiv-slamanlæg. I denne forbindelse er der gennemført fuldskala doseringsforsøg med BC-100 på Øster Hornum Renseanlæg i samarbejde med Kemira Water Danmark A/S.

I forbindelse med dette specialeprojekt vil jeg gerne takke professor ved Aalborg Universitet Per Halkjær Nielsen for vejledning i projektforsøget. Produktchef ved Kemira Water Danmark A/S, Anna-Marie Bøgh, takkes især for at have leveret de fornødne mængder af BC-100 og været særdeles behjælpelig med at gennemføre fuldskala doseringsforsøg på Øster Hornum Renseanlæg. Principal Scientist at R&D Inorganic Coagulants ved Kemira Water Sverige A/S, Britt Nilsson, takkes ved samme lejlighed for bl.a. at være behjælpelig med doseringsberegninger.

Desuden skal der lyde en stor tak til laborant Marianne Stevenson ved AAU for hjælp i laboratoriet og til ph.d. studerende Artur Tomasz Mielczarek ved AAU bl.a. for hjælp med at indhente data fra den Mikrobiologiske Database.

Anlægspasser Vagner Andersen ved bl.a. Øster Hornum Renseanlæg og laborant Nezada Muhovic ved Hobro Renseanlæg takkes for at tilsende slamprøver og data samt være behjælpelige med spørgsmål vedrørende anlæggene. Faggrubeleder Claus Drensgaard fra Driftsenheden i Rebild Kommune takkes ligeledes i denne forbindelse for at tilsende oplysninger om Øster Hornum Renseanlæg.

Indhold

Resume	2
Abstract (Engelsk resume)	3
Forord	5
1. Indledning	9
1.1 Driftsproblemer relateret til trådformede bakterier.....	9
1.1.1 Skumdannelse	9
1.1.2 Dårlig sedimentation	9
1.2 Trådformede bakterier der skaber skum- og sedimentationsproblemer	10
1.2.1 Mycolata.....	11
1.2.2 Microthrix parvicella	12
1.2.3 Trådformede bakterier med påvækster	13
1.3 Kontrolmetoder til bekæmpelse af trådformede bakterier	14
1.3.1 Kontrol af Mycolata med Bulk Control 100	15
2. Projektformål	17
2.1 Projektafgrænsning	17
3. Beskrivelse af renseanlæg	18
3.1 Øster Hornum Renseanlæg	18
3.2 Hvilsom Renseanlæg	20
4. Metoder	22
4.1 Vurdering af skumdannelse og bundfældningsegenskaber	22
4.1.1 Skummets udbredelse	22
4.1.2 Slamvolumenindeks	22
4.2 Metoder til identifikation af trådformede bakterier	22
4.2.1 Mikroskopering	22
4.2.2 Fluorescerende in situ hybridisering	23
4.3 Metoder til bestemmelse af bakteriernes overlevelse og aktivitet	24
4.3.1 Live/Dead staining	25
4.3.2 Respirationsaktivitet målt med CTC	26
5. Effekten af dosering med BC-100 på Øster Hornum Renseanlæg	27
5.1 Doseringsforløb	27
5.2 Indvirkning på skumdannelsen	28
5.3 Indvirkning på bundfældningsegenskaber.....	31
5.4 Mikroskopering af aktiv-slam og skum	33
5.4.1 Karakterisering af slammet før dosering med BC-100	33
5.4.2 Identifikation af trådformede bakterier	34
5.4.3 Effekten af dosering med BC-100	35
5.4.4 Gram- og Neisserfarvninger	37
5.4.5 Dyr, frie celler og partikler	37
5.5 Fysiologisk effekt på Mycolata ved dosering af BC-100.....	38
5.5.1 Indvirkning på Mycolatas overlevelse	38
5.5.2 Observeret respirationsaktivitet	42
5.6 Diskussion	42

5.6.1 Skumdannelsen	42
5.6.2 Mycolata.....	43
5.6.3 Flokbakterier og Type 0041/0675 (Chloroflexi)	44
5.7 Konklusion.....	44
5.8 Perspektivering.....	45
6. Skumdannelse på Hvilsom Renseanlæg	46
6.1 Ændring af bundfældningsegenskaber og skummets udbredelse	46
6.2 Mikroskopering af aktiv-slam og skum	48
6.2.1 Identifikation og omfang af trådformede bakterier	48
6.2.2 Gram- og Neisserfarvninger	49
6.2.3 Dyr, frie celler og partikler.....	50
6.3 Diskussion	50
6.3.1 Skum og bundfældningsegenskaber	50
6.3.2 Lav pH.....	50
6.4 Konklusion.....	51
6.5 Perspektivering.....	52
7. Forslag til driftsoptimering med henblik på kontrol af Mycolata	53
7.1 Analyse af anlægsdesign og drift	53
7.1.1 Dimensionerings- og beregningsgrundlag.....	53
7.1.2 Dimensionering i forhold til aktuel belastning	54
7.2 Forslag til kontrolmetoder til bekæmpelse af Mycolata	55
7.2.1 Kemisk kontrol	55
7.2.2 Fysisk kontrol.....	55
7.2.3 Processtyring	55
7.3 Forslag til driftsoptimering	56
7.4 Perspektivering i forhold til driftsoptimering.....	57
8. Referencer.....	58
BILAG 1: Datablad og Leverandørbrugsanvisning for BC-100	60
BILAG 2: Mikroskopering af aktiv-slam- og skumprøver.....	64
BILAG 3: Forsøgsmanual til FISH-analyse	65
BILAG 4: Forsøgsmanual til LDS.....	68
BILAG 5: Forsøgsmanual til CTC	69
BILAG 6: Metode til analyse af anlægsdesign og drift	70

1. Indledning

I mange år har trådformede bakterier i aktiv-slam skabt store driftsproblemer i forbindelse med spildevandsbehandlingen i danske såvel som udenlandske renselanlæg. Bakterietrådene, som består af mange sammensatte bakterier, der i forlængelse af hinanden danner de karakteristiske lange tråde, kan resultere i, at separationsprocessen af slam og udløbsvand ikke fungerer optimalt. Derved risikeres det, at letslammet sammen med det rensede spildevand løber direkte ud i recipienten, hvor det bl.a. kan skade vandmiljøet (Nielsen et al., 1999).

1.1 Driftsproblemer relateret til trådformede bakterier

Typisk kan driftsproblemer, der skyldes tilstedeværelsen af trådformede bakterier, opdeles i to problemtyper: skumdannelse eller dårlig bundfældning. Disse problemtyper er vidt forskellige og relaterer sig oftest til forskellige typer af trådformede bakterier.

1.1.1 Skumdannelse

Problemer med skumdannelse skyldes oftest trådformede bakterier af arten *Microthrix parvicella* og *Actinobacteria* indeholdende mycolic acid (Jenkins et al., 1993) også kaldet *Actinomycetes* eller Mycolata. Disse bakterier er i stand til at danne et tykt skumlag på hele procestanken, som kan opstå i løbet af bare en enkelt nat. Dette kan resultere i slamflugt og samtidig bevirke, at der sker en stærk kvalitetsforringelse af udløbsvandet (Kragelund et al., 2006).

Et stigende trådindeks (TI) grundet *Microthrix* kan indikere, at anlægget trues af skumdannelse. Det kan dog være svært at bedømme omfanget af Mycolata i slammet på samme måde, da disse filamenter er meget små og oftest befinder sig inden i flokkene. Der vil således kunne ske en pludselig og voldsom opblomstring af Mycolata, selvom dette i første omgang ikke vil kunne ses af TI. Det kan derfor være svært at forudsige, hvornår skumdannelsen finder sted, men dette skyldes tillige, at årsagerne til skumdannelsen endnu ikke er fuldt klarlagt (Kragelund, 2006).

En primær årsag til skumdannelsen er, at *Microthrix* og Mycolata begge er Gram-positive bakterier. De har derfor en hel eller delvis hydrofob celleoverflade, som bevirker, at bakterierne søger væk fra vandfasen. I stedet vedhæfter trådene sig gasboblerne i slammet og bliver derved transporteret op til vandoverfladen, hvor de danner skum (Eikelboom, 2002). Disse skumdannende bakterier er desuden i stand til selv at producere hydrofobe partikler og overfladestoffer, som menes at stabilisere gasboblerne og derved virke fremmende på skumdannelsen (Kragelund, 2006).

1.1.2 Dårlig sedimentation

Der kan være flere årsager til, at sedimentationen af slammet ikke forløber efter hensigten, men overordnet kan disse problemer inddeles i to kategorier; sedimentationsproblemer der skyldes tilstedeværelsen af for få eller for mange trådformede bakterier (Jenkins et al., 1993).

De trådformede bakterier skaber stabilitet i slamflokkene og er således medvirkende til, at der dannes store sedimenterbare flokke. I en ideel slamflok virker de trådformede bakterier således som ryggraden i flokken, hvorpå flokbakterierne fasthæfter sig. For få trådformede bakterier i slammet kan derfor medføre, at der dels er mange enkeltceller i vandfasen, og dels kun dannes meget små slamflokke - såkaldte pin point-flokke. De små flokke og frie celler sedimenterer ikke tilfredsstillende og kan tilmed skabe en uklar vandfase over det sedimenterede slam. Modsat bevirker for mange trådformede bakterier i slammet, at trådene kan skabe et netværk mellem slamflokkene, som resulterer i, at slammet får svært ved at bundfælde (Jenkins et al., 1993).

1.2 Trådformede bakterier der skaber skum- og sedimentationsproblemer

Ved Aalborg Universitet udføres der i øjeblikket et forskningsprojekt i samarbejde med Dansk Spildevandsteknisk Forening og i alt 47 danske renseanlæg. Projektet, som kaldes Den Mikrobiologiske Database, strækker sig fra 2006 til og med 2010 (Nielsen pers. kom., 2007) og har bl.a. til formål at skabe et overblik over, hvilke trådformede bakterier der typisk findes i det aktive slam i danske renseanlæg (Nielsen et al., 2007). Idet de trådformede bakterier i dag anses for at være en af de mest almindelige årsager til driftsproblemer i danske såvel som udenlandske renseanlæg (Nielsen et al., 1999), forsøger projektet ligeledes at klarlægge hvilke trådtyper, der påvirker driften af anlæggene og hvordan.

Dårlige bundfældningsegenskaber er et af de problemer der ofte kan relateres til forskellige trådformede bakterier. TI > 2 på en skala fra 0 til 5 giver typisk anledning til forringede eller dårlige bundfældningsegenskaber. I de slamprøver fra 2007, hvor TI var over 2, blev de trådformede bakterier identificeret som en given morfotype ifølge Eikelbooms manual (2002). Den hyppigste trådformede bakterie var Type 0041/0675, som var til stede i alle anlæg i varierende mængde. Analyse med genprober bekræftede, at type 0041/0675, som var dominerende tråd i mange anlæg, især tilhører gruppen *Chloroflexi*. I denne gruppe findes flere arter, som er forskellige af udseende, både hvad angår længde, tykkelse og tilstedeværelsen af påvækster (Mielczarek et al., 2008).

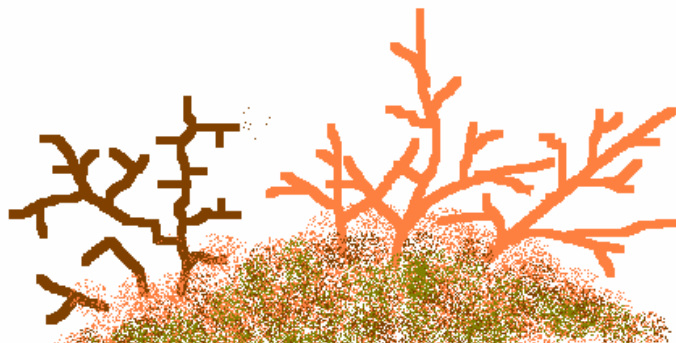
Microthrix var ligeledes en hyppigt forekommende trådformet bakterie, som var til stede i mere end halvdelen af anlæggene og den dominerende art i omkring 35 %. Tilstedeværelsen af *Microthrix* synes normalt, at være afhængig af årstiden, da der ofte ses flest om vinteren. Denne tendens var dog mindre tydelig i 2007, hvilket kan skyldes, at der i 2007 ikke var så store temperatursvingninger i årets løb (Mielczarek et al., 2008). Årsagen til, at *Microthrix* ikke var den dominerende trådformede bakterie i langt de fleste anlæg, er formentlig, at der doseres PAX som kontrolkemikalie i mange anlæg, hvor der er begyndende problemer i form af dårlige bundfældningsegenskaber og/eller skumdannelse grundet *Microthrix*. Doseringen af PAX synes dog ikke at kunne kontrollere type 0041/0675 (*Chloroflexi*), hvorfor det i stedet ofte er denne tråd, som dominerer i anlæg med PAX-dosering. Der findes i øjeblikket ingen effektive kontrolmetoder til at bekæmpe *Chloroflexi* (Mielczarek et al., 2008).

I løbet af 2007 oplevede flere af de deltagende anlæg også skumproblemer forårsaget af *Microthrix* og *Mycolata*, men dette var dog langt mindre udbredt end sedimentationsproblemerne (Stevenson pers. kom., 2008). Heller ikke *Mycolata* kan på nuværende tidspunkt kontrolleres effektivt.

1.2.1 *Mycolata*

I løbet af det seneste årti er der blevet rapporteret et stadigt stigende antal tilfælde af skumdannelse forårsaget af *Mycolata* i såvel traditionelle som industrielle renselanlæg i Danmark (Kragelund et al., 2007 A). *Mycolata* er morfologisk set let genkendelig, da bakterier af denne type danner tråde med ægte forgreninger. Disse immobile filamenter er almindeligvis korte, bøjede og findes typisk i bundter i og omkring slamflokkene. Cellediameteren er oftest 0,5-0,7 μm , og filamenterne kan blive op til 200 μm lange. *Mycolata* er Gram-positiv og oftest Neisser negativ men kan tillige fremstå Neisser-positiv med poly-P granuler ind i cellerne (Eikelboom, 2002). Gram-farvninger i forbindelse med mikroskopering af slammet er meget anvendelige til at afsløre omfanget af *Mycolata* og dermed forudsige skumdannelse (Kragelund, 2006).

Mycolata dækker over en hel række af forskellige arter, som ud fra morfologi opdeles i *Gordonia amarae* (GALO - tidligere kaldet *Nocardia amarae*, NALO) og *Skemania piniformis* (PTLO) (Kragelund et al., 2007 A). GALO og PTLO kan ud fra morfologien adskilles fra hinanden, idet forgreningerne er af forskellig størrelse og placering, se figur 1. Forgreningerne på *Gordonia amarae* sidder vinkelret på stammen og er oftest af vilkårlig længde. På *Skemania piniformis*-filamenterne udgår forgreningerne fra stammen i vilkårlige vinkler, og oftest er forgreningerne kortere øverst på stammen end ved roden, hvilket giver et fyrretræ-lignende udseende (Kragelund et al., 2007 A). Selvom det lyder enkelt, er en morfologisk identifikation af *Mycolata* dog ikke altid så lige til. Dette skyldes, at filamenterne ligeledes kan fremstå som en mellemtung mellem de to beskrivelser, uforgrenede tråde, kugle- eller stavformede bakterier. Det varierende udseende formodes at være relateret til transformationen mellem forskellige vækststadier (Soddell & Seviour, 1990). Det er derfor ofte nødvendigt at anvende mere avancerede molekylærbiologiske metoder for at opnå en korrekt identifikation.



Figur 1: Slamflok med *Gordonia amarae* (tv) og *Skemania piniformis* (th).

Opblomstringen af Mycolata kan komme pludseligt og føre ofte til skumdannelse i større eller mindre omfang. Men Mycolata har i modsætning til *Microthrix* oftest kun en meget begrænset indvirkning på slammets bundfældningsegenskaber. Dette skyldes at filamenterne er meget små og derfor ikke danner bro mellem flokkene på samme måde som *Microthrix*. Samtidig bevirker den hydrofobe overflade, at Mycolata typisk findes i et langt større omfang i skummet sammenlignet med det aktive slam. Ofte er Mycolata således ikke den dominerende tråd i aktiv-slammet i længere perioder (Eikelboom, 2002).

Nyere undersøgelser har vist, at Mycolata kan leve af en bredere vifte af substrater end *Microthrix*. Det menes dog, at fedt og fedtliggende substrater er den primære fødekilde for Mycolata i traditionelle renseanlæg (Kragelund et al., 2007 A; Eikelboom, 2002). Idet fedt ligeledes er hydrofobt, vil sådanne substrater søge væk fra vandfasen og op til vandoverfladen. På denne måde kan der skabes særdeles gode vækstbetingelser for Mycolata i skumlaget (Eikelboom, 2002). Spildevand med en relativ høj temperatur (>15 °C), som indeholder fedt og andre hydrofobe komponenter, anses for at give gode vækstbetingelser for Mycolata (Jenkins et al., 1993; Eikelboom, 2002). Men også anlæg, som ikke opfylder dette, har vist sig at have problemer med skumdannelse forårsaget af Mycolata. Det er derfor svært at fastslå præcist hvilke procesparametre, der har betydning for forekomsten af Mycolata, hvilket ydermere gør det vanskeligt at bekæmpe denne bakteriegruppe.

1.2.2 *Microthrix parvicella*

I de seneste år har *Microthrix* været en af de hyppigst forekomne trådformede bakterier i danske renseanlæg (Nielsen et al, 2007), og på verdensplan anses bakterien i dag for at skabe de største problemer med letslam og skum i aktiv-slamanlæg (Nielsen et al, 1999). *Microthrix* kan foruden at være skumdannende tillige have en negativ indvirkning på bundfældningen af slammet, idet trådene kan stikke ud fra slamflokkene og derved påvirke flokstrukturen, se figur 2 (Kragelund, 2006).



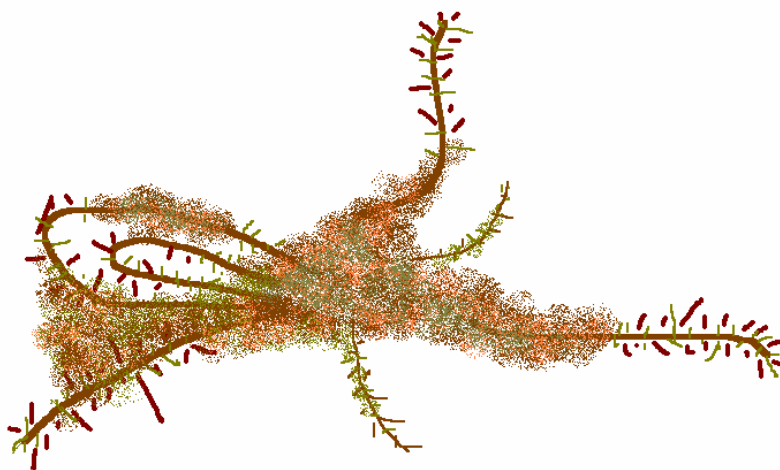
Figur 2: Bøjede tråde af *Microthrix parvicella*, som primært befinder sig i slamflokkene, hvor fra de stikker ud.

Microthrix har vist sig kun at leve af lange komplekse fedtsyremolekyler, som den kan omsætte både vha. ilt og nitrat. Samtidig er den i stand til at oplagre store mængder fedt under anaerobe forhold for så senere at omsætte substratet under aerobe eller anoxiske forhold. Denne egenskab gør *Microthrix* i stand til at konkurrere med de mange andre bakterier i slammet, som kun kan optage og udnytte fedtsyrerne under aerobe forhold (Nielsen et al, 1999). Da fedt typisk udgør omkring en tredjedel af det organiske materiale, som findes i spildevandet (Nielsen et al, 2007), bevirker dette, at *Microthrix* for det meste har rigeligt med substrat til rådighed og derfor kan trives særdeles godt i slammet.

1.2.3 Trådformede bakterier med påvækster

I de danske renselanlæg, hvor slammet i 2006 blev undersøgt i forbindelse med Den Mikrobiologiske Database, har trådformede bakterier med påvækster - heraf især Type 0041/0675 - vist sig at være hovedansvarlige for slammets dårlige bundfældnings-egenskaber, når *Microthrix* ikke er dominerende.

De trådformede bakterier med påvækster er ofte helt eller delvist gemt inde i slamflokkene (se figur 3), og det kan derfor være svært umiddelbart at vurdere deres omfang (Nielsen et al, 2007). Det er samtidigt vanskeligt at identificere de mange arter, hvilket tillige gør det svært at undersøge deres forskellige egenskaber og levevis. Dog har nye undersøgelser fastslået at Type 0041/0675, Type 1851 og Type 1701 især lever af at nedbryde proteinholdige partikler i spildevandet, mens de i nogen grad også omsætter forskellige former for sukkerforbindelser (Nielsen et al, 2007).



Figur 3: Trådformede bakterier med påvækster, som dels danner flokkens ryggrad, og dels stikker ud af slamflokken.

På nuværende tidspunkt findes der ingen velegnede kontrolmetoder til at reducere antallet af trådformede bakterier med påvækster (Nielsen et al, 2007). Viden om trådenes vækstbetingelser kan derfor vise sig at være en stor fordel i forbindelse med udviklingen af selektive metoder til at kontrollere de forskellige typer trådformede bakterier med påvækster.

1.3 Kontrolmetoder til bekæmpelse af trådformede bakterier

Der findes flere forskellige metoder til kontrol af trådformede bakterier, hvoraf nogle rammer bakterierne generelt, mens andre metoder er mere selektive overfor bestemte bakterietråde. Af generelle doseringsmidler kan bl.a. nævnes ozon, brintperoxid og klor (Jenkins et al., 1993), mens selektorer og dosering af PAX-14 er eksempler på selektive metoder, der har til formål at kontrollere bestemte typer af trådformede bakterier.

Dosering af klor, som benyttes i stort omfang i USA (Jenkins et al., 1993), har vist sig at være en effektiv metode til at kontrollere væksten af de trådformede bakterier (Nielsen et al., 1999). Ifølge Jenkins et al. (1993) bør klor dog generelt kun doseres til aktiv-slamanlæg som en nødløsning. Dette skyldes bl.a., at det i praksis kan være vanskeligt at bestemme den rette mængde klor, idet formålet med klordoseringen er at kontrollere de trådformede bakterier, der stikker ud fra flokkene, men på samme tid undgå deflokkulering eller inhibering af de gavnlige flokbakterier (Séka et al., 2002). Risikoen for, at der dannes miljøskadelige biprodukter i form af klorerede forbindelser, er et andet problem ved dosering af klor (Kragelund, 2006). Hvis det er nødvendigt at dosere klor i en længere periode for at opnå en effektiv reduktion i antallet af trådformede bakterier, anbefales det derfor i stedet at overveje andre løsninger (Jenkins et al., 1993).

Princippet bag selektorer bygger på flere kilders teori om, at de flokdannende bakterier optager og lagre substrat hurtigere samt har maksimale væksthastigheder ved høje substratkoncentrationer i forhold til mange trådformede bakterier, som foretrækker noget lavere substratkoncentrationer (Jenkins et al., 1993). Den høje substratkoncentration i indløbet til renseanlægget er således en fordel for de flokdannende bakterier, mens den lave substratkoncentration i udløbet, giver mange trådformede bakterier en fordel. Specielt letomsætteligt stof har vist sig at give problemer, hvis ikke dette omsættes ved en høj substratbelastning. Selektorer har derfor til formål at skabe kraftige substratgradienter gennem aktiv-slamanlægget for derved at give favorable vækstbetingelser for flokbakterierne og samtidig hæmme væksten af bestemte trådformede bakterier. Når aktiv-slammets indløb i den lave substratkoncentration i beluftningstanken ledes gennem en zone med høj substratkoncentration, vil dette favorisere væksten af flokbakterier. Dette skyldes formentligt også, at mange typer flokbakterier har en større oplagringskapacitet end mange trådformede bakterier. Dertil kommer at flokbakterierne formodes at være mere modstandsdygtig overfor sult (Jenkins et al., 1993).

Selektorer kan være enten aerobe, anoxiske eller anaerobe, hvoraf de to sidstnævnte typer er de mest effektive. Typen af selektor afhænger af den aktuelle anlægskonfiguration og spildevandssammensætningen samt hvilke trådformede bakterier, der skal kontrolleres. I anoxiske selektorer benyttes det, at letomsætteligt substrat omsættes under denitrifikationsprocessen. Idet kun en mindre del af de trådformede bakterier er i stand til at denitrificere, skaber de anoxiske forhold et selektionspres til fordel for de denitrificerende flokbakterier. Anaerobe selektorer selekterer derimod de organismer, der kan optage substrat under anaerobe forhold herunder primært fosforakkumulerende bakterier. De anaerobe forhold kan kontrollere de fleste typer trådformede bakterier, dog ikke *Microthrix* (Jenkins et al., 1993).

PAX-14, som anvendes til bekæmpelse af *Microthrix*, er en polyaluminiumkloridopløsning, som kan binde fosfor kemisk. Det bør derfor ikke doseres inden kemisk fosforfældning, da denne fældningsproces så ikke virker optimalt (Pedersen og Sørensen, udateret). Det vides ikke med nøjagtighed, hvordan PAX-14 virker på *Microthrix*, men forsøg har vist, at aktiviteten af det exoenzym, som bakterien udskiller, bliver kraftigt reduceret efter doseringen af PAX-14. Derved forhindres bakterien i at nedbryde de komplekse fedtsyrer, som den lever af, og den vil derfor med tiden blive udkonkurreret af de øvrige bakterier i aktiv-slammets (Nielsen et al., 2005). Allerede efter 10-15 dages dosering med PAX-14 kan der oftest observeres forbedrede bundfældningsegenskaber, og mængden af skum er tilmed reduceret. Det anbefales dog at fortsætte med doseringen i mindst 3 uger for at sikre en vedvarende effekt.

1.3.1 Kontrol af Mycolata med Bulk Control 100

Mycolata er i flere tilfælde forsøgt kontrolleret med både aerobe, anaerobe og anoxiske selektorer afhængigt af typen af renseanlæg. I kritiske tilfælde er dosering med klor eller brintperoxid ligeledes blevet anvendt for at opnå en reduktion i antallet af Mycolata. Implementeringen af selektorer er imidlertid ofte en bekostelig affære, mens dosering med klor eller brintperoxid som nævnt kan resultere i dannelsen af miljøskadelige biprodukter (Jenkins et al., 1993). Der findes endnu ikke et middel på markedet, som effektivt kan kontrollere væksten af Mycolata (Kragelund et al., 2007 B). Men i et forsøg på at imødekomme en stigende efterspørgsel er Kemira Water netop nu i færd med at udvikle et nyt produktkoncept, som har til formål at reducere antallet af Mycolata og derved afhjælpe skumproblemer (Nilsson & Eskilsson, 2007).

Produktet, som kaldes Kemira Water Bulk Control 100 (BC-100), er en blanding af calciumklorid (10 w%), polyamine polymer (5w%) og vand. Produktets indhold af calciumklorid har to funktioner, idet calciumklorid dels er medvirkende til at forbedre flokstrukturen i slammets, og dels sænker frysepunktet for produktet ned til -10 °C. Polyamine polymeren, som udgør den vigtigste del af produktet, har til hensigt at få Mycolata i vandfasen til at flokkulere. Derved bevirker densitetsforøgelsen, at Mycolata forbliver i slammets, og som følge heraf reduceres skumdannelsen (Nilsson & Eskilsson, 2007). Udover at afhjælpe skumproblemer forbedrer BC-100 ligeledes slammets egenskaber, idet det kan afhjælpe problemer med spredt vækst i form af frie celler. Desuden kan BC-100 i akutte situationer sænke slammets volumenindeks (Nilsson & Eskilsson, 2007). Datablad og leverandørbrugsanvisning for BC-100 findes i bilag 1.

BC-100 er foreløbig blevet testet i enkelte fuldskala doseringsforsøg i svenske aktivslamanlæg. Disse forsøg har givet gode resultater, idet BC-100 viste sig at kunne kontrollere skumdannelse i anlæggene, som var forårsaget af Mycolata. Det vides dog endnu ikke helt, hvordan BC-100 virker på Mycolata, hvorfor yderligere forsøg til klarlægning af dette er nødvendigt (Kragelund et al., 2007 B). Ydermere har nye undersøgelser vist, at bakteriegruppen Mycolata består af mange forskellige bakterier, som ikke kan skelnes fra hinanden ved direkte mikroskopering (Kragelund et al., 2007 A). Udfra de forsøg, som er foretaget i de svenske aktivslamanlæg, er det således svært at vurdere, hvorledes BC-100 egner sig til bekæmpelse af Mycolata i danske anlæg, hvor

lignende skumproblemer ses, men hvor bakteriesammensætningen måske er anderledes. For at kunne klarlægge dette, er det således nødvendigt at foretage lignende fuldskalaforsøg i danske anlæg, hvor Mycolata er dominerende.

2. Projektformål

Formålet med dette specialeprojekt er at undersøge, hvorvidt skumdannende bakterier tilhørende gruppen Mycolata kan kontrolleres ved dosering af BC-100 i aktiv-slamanlæg.

2.1 Projektafgrænsning

Ud fra problemformuleringen opdeles dette projekt i to dele, som først behandles særskilt og dernæst sammenlignes og diskuteres. I det følgende beskrives og afgrænses projektet.

Del I: Dosering af BC-100 på Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg

Virksomheden af BC-100 på skumdannende Mycolata undersøges. Produktkonceptet BC-100 testes i fuldskala på hhv. Øster Hornum Renseanlæg ved Støvring og Hvilsom Renseanlæg ved Hobro. Disse to danske aktiv-slamanlæg har begge oplevet skumdannelse i større eller mindre omfang forårsaget af Mycolata. Anlæggene er derfor oplagte muligheder til at teste effekten af BC-100 på Mycolata i fuldskala under danske forhold. I forbindelse hermed undersøges følgende:

- Udbredelsen af skummet følges ved løbende at måle længden og tykkelsen af skumlaget
- Slammets bundfældningsegenskaber vurderes ud fra slamvolumenindeks (SVI)
- De dominerende bakterier i slam og skum identificeres vha. mikroskopering og metoden Fluorescerende *in situ* Hybridisering (FISH)
- Andelen af levende skumdannende trådformede bakterier og flokbakterier undersøges vha. metoden Live/Dead Staining (LDS)
- Aktiviteten af skumdannende trådformede bakterier og flokbakterier undersøges vha. metoden CTC.

På selve anlæggene observeres det således, hvordan doseringen af BC-100 overordnet påvirker skumdannelsen og bundfældningsegenskaberne i anlægget. Desuden udtages der slam- og skumprøver to gange om ugen før, under og efter doseringen af BC-100, og heraf undersøges mikrobiologien i anlægget.

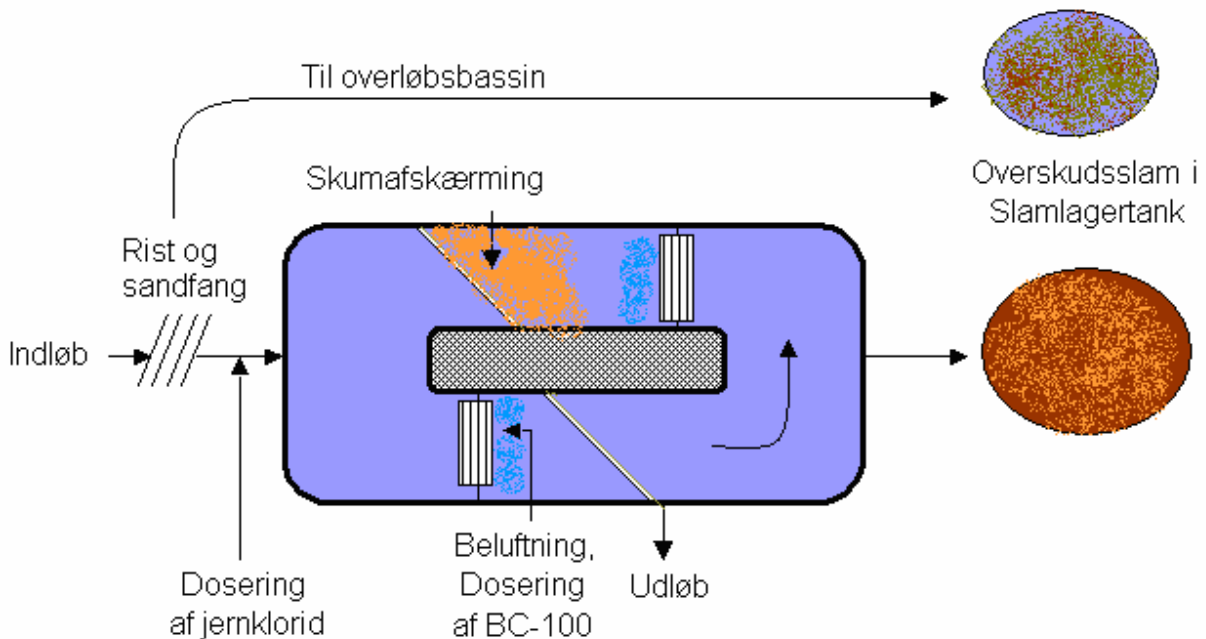
Del II: Forslag til driftsoptimering der begrænser skumdannelse forårsaget af Mycolata

Dimensioneringen og driften af både Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg analyseres med henblik på driftsoptimering, der kan afhjælpe problemer med skumdannende Mycolata.

3. Beskrivelse af renseanlæg

3.1 Øster Hornum Renseanlæg

Øster Hornum Renseanlæg ved Støvring er et en-tanks renseanlæg (sequential batch reactor) med en rensekapacitet på 1100 PE og en aktuel belastning på ca. 750 PE, som udelukkende stammer fra husspildevand. Afhængigt af regnvandsmængden modtager renseanlægget en døgnvandmængde svarende til 226-524 m³. Renseanlægget består af en grovryst med tilknyttet sandfang, en ringkanal, et overløbsbassin samt en slamlagertank. Når spildevandet ankommer til anlægget, ledes det først gennem grovrysten og sandfanget, hvorved sand og grovere bestanddele i spildevandet tilbageholdes. Dernæst ledes spildevandet videre til ringkanalen (procestanken), som skiftevis fungerer som luftningsbassin og sedimentationstank. I ringkanalen, hvor fjernelsen af fosfor, ammonium, COD og SS finder sted, cirkulerer og beluftes spildevand og aktiv-slam vha. to rotorer. Herved omsætter det aktive slam COD og omdanner ammonium til nitrat gennem nitrifikation. Tilsætning af jernklorid sikrer, at der samtidig sker en udfældning af jernfosfat. Denitrifikation finder ikke sted på anlægget. Anlæggets opbygning ses af figur 4.



Figur 4: Principskitse over Øster Hornum Renseanlæg. Under doseringsforsøget doseres BC-100 umiddelbart efter den ene rotor.

Spildevandet tilledes ringkanalen og beluftes ind til en fastsat vandstand på 1,2 m er nået. Det øvrige spildevand ledes til overløbsbassinet, indtil der igen er plads i ringkanalen. Efter endt beluftning bundfælder slammet i ringkanalen i ca. 1 time (driftspause), før kippen til overløbet åbnes. Det rensede spildevand udledes til recipienten, ind til vandstanden er sænket til 1 m. Kippen er lukket under beluftningen, og der tilledes ikke spildevand i bundfældningsperioden. Overskudsslammet, som én gang i døgnet udtages

vha. pumper, udgør 20 m³ om ugen. Overskudsslammet pumpes i første omgang til slamlagertanken, hvor det koncentrerer, inden det køres til Aalborg Renseanlæg Øst, hvor det afvandes og tørres. Drænvandet i slamlagertanken ledes tilbage til ringkanalen. Slamalderen varierer omkring 41-47 dage (Andersen pers. kom., 2007). Anlægsconfiguration og procescyklus for Øster Hornum Renseanlæg ses af tabel 1

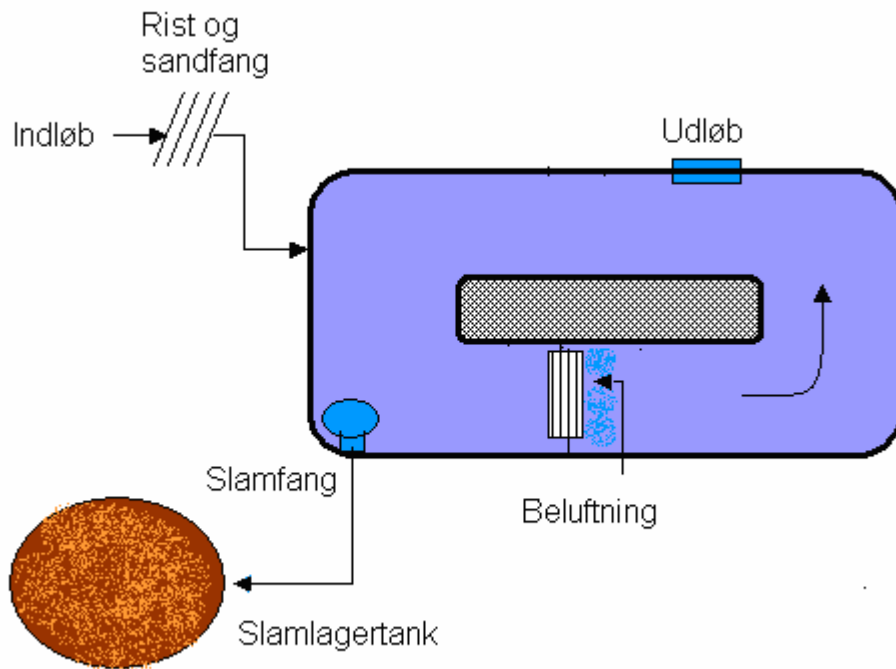
Tabel 1: Anlægsconfiguration og procescyklus for Øster Hornum Renseanlæg (Andersen pers. kom. 2007; Rebild kommune, 2007).

<i>Parameter</i>	<i>Værdi</i>	<i>Enhed</i>
Dimensioneret belastning	1100	PE
Aktuel belastning	750	PE
Volumen af ringkanal (drift)	475	m ³
Volumen af overløbsbassin	-	m ³
Tid pr. cyklus	8	timer
Beluftningstid (aerob opholdstid)	6	timer/cyklus
Sedimentationstid	0,75-1	timer/cyklus
Udledning af rensed spildevand	1	timer/cyklus
Slamkoncentration	2,5	kgSS/ m ³
Slamalder	ca. 44	dage
Udtaget overskudsslam	20	m ³ /ugen
Minimumstemperatur i procestank (2007)	8	°C
Middel pH i procestank	7,7	-

For at sikre en tilfredsstillende bundfældning doseres der normalt også PAX XL-342 under beluftningen, men denne dosering blev stoppet forud for doseringsforsøget med BC-100. Dette havde til formål at skabe favorable vækstbetingelser for Mycolata og derved fremprovokere skumdannelse i anlægget, således at doseringsforsøget kunne sættes i gang.

3.2 Hvilsom Renseanlæg

Hvilsom Renseanlæg, som ligger nær Hobro, er ligesom Øster Hornum Renseanlæg et ringkanalssystem, der anvender nitrifikation men ikke denitrifikation. Renseanlægget har en renskapacitet på 600 PE og tilledes kun husspildevand. Anlægget består af en grovryst med tilknyttet sandfang, en ringkanal samt en slamlagertank. Anlæggets opbygning ses af figur 5.



Figur 5: Principskitse over Hvilsom renselanlæg

Som på Øster Hornum Renseanlæg ledes spildevandet først gennem grovrysten og det tilknyttede sandfang og dernæst videre til ringkanalen, hvor de biologiske processer finder sted. Spildevandet og aktiv-slam beluftes her indtil vandstanden i processtanken har nået et niveau på 1 m. Beluftningen sker vha. en enkelt rotor for at sikre en optimal nitrifikation. Efter beluftningen får slammet lov til at sedimentere i ca. 30 min (driftspause), mens der stadig tilledes spildevand. Ved en vandstand på 1,3 m åbnes kippen til overløbet, og det rensede spildevand ledes ud i recipienten. Det bundfældede slam pumpes fra ringkanalens slamfang til slamlagertanken, hvorfra det køres til Hobro Renseanlæg til videre behandling (Muhovic, 2007). Anlægsconfiguration og procescyklus for Hvilsom Renseanlæg ses af tabel 2.

Tabel 2: Anlægsconfiguration og procescyklus for Hvilsom renseanlæg (Muhovic pers. kom. 2007; Mariager Fjord Kommune, 2007).

<i>Parameter</i>	<i>Værdi</i>	<i>Enhed</i>
Dimensioneret belastning	600	PE
Aktuel belastning	-	PE
Volumen af ringkanal (drift)	301	m ³
Tid pr. cyklus	-	timer
Beluftningstid (aerob opholdstid)	-	timer/cyklus
Sedimentationstid	-	timer/cyklus
Udledning af rensset spildevand	-	timer/cyklus
Slamkoncentration	3,3*	kgSS/ m ³
Slamalder		dage
Udtager overskudsslam	-	m ³ /ugen
Minimumstemperatur i procestank	10	°C
Middel pH i procestank	-	-

*Middelværdien for den periode, hvor der blev modtaget prøver fra anlægget (efteråret 2007)

4. Metoder

4.1 Vurdering af skumdannelse og bundfældningsegenskaber

4.1.1 Skummets udbredelse

Skummets udbredelse er et direkte billede på problemets omfang og anvendes derfor som et mål for effekten af BC-100. Anlæggenes udformning gør det imidlertid vanskeligt at beregne det areal, som skumlaget dækker. Derfor er skummets udbredelse på Øster Hornum Renseanlæg i stedet blevet målt ud fra længden af skumlaget efter skumafskærmningen i kanalen. Skummet i Hvilsom blev i første omgang bedømt på øjemål ud fra de ansamlinger af skum, der var spredt i hele kanalen.

4.1.2 Slamvolumenindeks

Slamvolumenindekset (SVI) og/eller det fortyndede slamvolumenindeks (FSVI) kan ofte give et fingerpeg om slammets bundfældningsegenskaber. I begge anlæg er SVI eller FSVI derfor løbende blevet beregnet for at undersøge hvorvidt BC-100 har betydning for bundfældningen af slammet. Normalt anses slam med et SVI under 150 mL/g eller et FSVI under 120 mL/g for værende slam med gode eller tilfredsstillende bundfældningsegenskaber (tabel 3). Hvis SVI eller FSVI overstiger disse værdier, anses slammet for at have forringede bundfældningsegenskaber, mens slam med SVI eller FSVI over hhv. 200 mL/g og 160 mL/g betegnes som dårligt bundfældende (Nielsen, 2007).

Tabel 3: Oversigt over sammenhængen mellem SVI eller FSVI og bundfældningsegenskaber (Nielsen, 2007)

<i>Bundfældningsegenskaber</i>				
	<i>Gode</i>	<i>Tilfredsstillende</i>	<i>Forringede</i>	<i>Dårlige</i>
SVI	< 100	100-150	150-200	>200
FSVI	< 90	90-120	120-160	>160

4.2 Metoder til identifikation af trådformede bakterier

4.2.1 Mikroskopering

Undersøgelse af slamprøver i mikroskop er den metode, som typisk benyttes til karakterisering af aktiv-slammet på renseanlæg. Til dette formål anvendes manualerne fra Eikelboom (2002) og Jenkins et al. (2004) (Nielsen et al., 2007). Manualerne giver en grundig beskrivelse og billedlig gengivelse af de forskellige trådformede bakterier, deres udbredelse og indvirkning på flokkene samt kvaliteten af slamflokkene og diversiteten af dyrelivet i slammet. Dette gør det muligt ud fra morfologien at identificere de trådformede bakterier og bedømme slammets karakter.

Mængden af trådformede bakterier mellem flokkene afgør hvilket TI, der bedst betegner prøven. TI angives således med et tal på en skala fra 0 til 5, hvor 0 svarer til, at der ingen tråde observeres, mens 5 svarer til rigtig mange tråde.

Da den morfologiske beskrivelse af de trådformede bakterier ikke altid er tilstrækkelig til at fastslå, hvilke arter der er til stede i slammet, kan farvemetoder som Gram- og Neisserfarvning anvendes. Ved Gram- og Neisserfarvningerne overføres og udsprede en dråbe prøve til et objektglas, hvorpå der anvendes forskellige farvereagenser afhængigt af, hvilken farvemetode, der benyttes. Ved Gramfarvningen anvendes reagenserne krystalviolet og safranin, som farver bakterierne afhængigt af strukturen af cellevæggen. De bakterier, som er Grampositive, vil således farves violette eller blå, mens Gramnegative bakterier farves røde (Iversen, 2005). Ved Neisserfarvningen, som benyttes til at påvise fosforholdige korn inde i bakterierne, anvendes methylen blå og krystalviolet. Disse farvereagenser vil farve de fosforholdige korn blå i positive bakterier, mens de negative vil fremstå brunlige. Visse bakterier, som ligeledes er positive, kan dog også fremstå gråblå. De farvede præparater undersøges i lysmikroskop ved 1000 gange forstørrelse og gennemlysning (Nielsen, 1997).

Under hele projektforsøget er aktiv-slam- og skumprøver fra Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg blevet mikroskopert. Hensigten hermed var dels at karakterisere aktiv-slam og skum mht. dets tilstand, og dels at undersøge hvor stor en andel Mycolata udgør af den samlede population af trådformede bakterier. Desuden blev der lavet Gram- og Neisserfarvninger for at underbygge den morfologiske identifikation af trådene. Det skema, der er anvendt til karakterisering af slammet, findes i bilag 2.

4.2.2 *Fluorescerende in situ hybridisering*

Fluorescerende *in situ* hybridisering er en molekylærbiologisk metode, der kan anvendes til at visualisere, identificere og lokalisere mikroorganismer i prøver fra renkulturer såvel som komplekse miljøer.

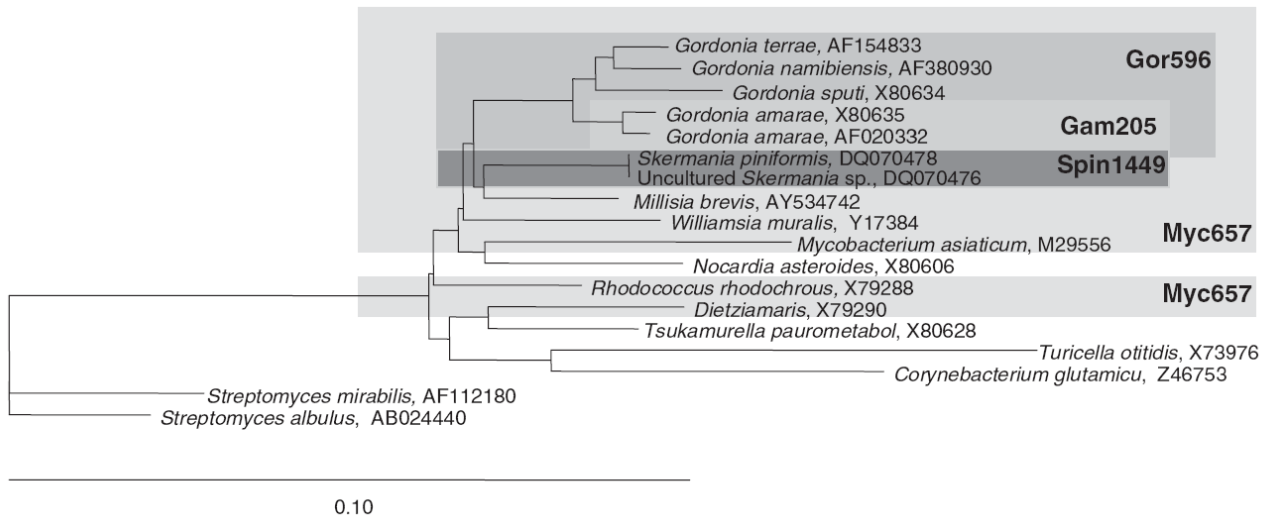
Metoden bygger på, at RNA-prober kan trænge ind i en bakterie, som efterfølgende hybridiserer ribosomalt RNA (rRNA) direkte i ribosomerne (Madigan & Martinko, 2006). Sekvenserne for rRNA er særdeles anvendelige ved denne metode, da disse nukleotidstrengene indeholder både sekvenser, der er identisk for alle bakteriearter, og sekvenser, som er unikke for en enkelt art. Proberne kan således designes med forskellige specificiteter, således at en specifik probe kun rammer én enkelt specifik bakterieart, som derved kan identificeres i prøven (Lee et al., 1998).

På proberne er der som markør påsat fluorokromer, som bevirker, at de prober, der er trængt ind i cellen og efterfølgende hybridiserer rRNA, vil få hele cellen til at lyse op, når prøven undersøges i fluorescensmikroskop. Dette skyldes, at markøren vil fluorescere, når prøven belyses med den rette bølgelængde. Typisk anvendes der i denne sammenhæng markører af typen Fluos eller Cy3, som fluorescerer hhv. grønt og rødt (Lee et al., 1998).

Da Mycolata dækker over flere arter, er det en stor fordel at kunne identificere disse trådformede bakterier yderligere, idet identifikationen således gør det muligt at fastslå, hvilke arter der påvirkes af BC-100, og hvilke arter, der ikke påvirkes. I forbindelse med identifikation af Mycolata er følgende 16S rRNA oligonucleotid genprober blevet anvendt:

- Myc-657 (Davenport et al., 2000) – der rammer Mycolata
- GOR-596 (De los Reyes et al., 1997) – der specifikt rammer *Gordonia*
- Spin-1449 (Eales et al., 2006) – der specifikt rammer *Skermania*

Det fylogenetiske træ, som fremgår af figur 6, viser et udvalg af kendte Mycolata sekvenser og illustrerer specifikationen af de anvendte 16S rRNA genprober. I forbindelse med FISH-analysen anvendes desuden proben EUB-mix (Daims et al., 1999), som en positiv kontrol. Denne probe har til formål at ramme alle bakterier, og gør det derfor muligt at kontrollere, hvorvidt de øvrige prober giver et falsk negativt signal (Kragelund et al., 2007 A). En mere uddybende beskrivelse af forsøget findes i bilag 3.



Figur 6: Stamtræet er baseret på 16S rRNA for udvalgte Mycolata med forgrenet morfologi tilhørende Actinobacteria fylum. Skalaen svarer til 10 % sekvensforskel, og træet er beregnet på basis af metoden neighbor-joining i ARB (Kragelund et al., 2007 A)

4.3 Metoder til bestemmelse af bakteriernes overlevelse og aktivitet

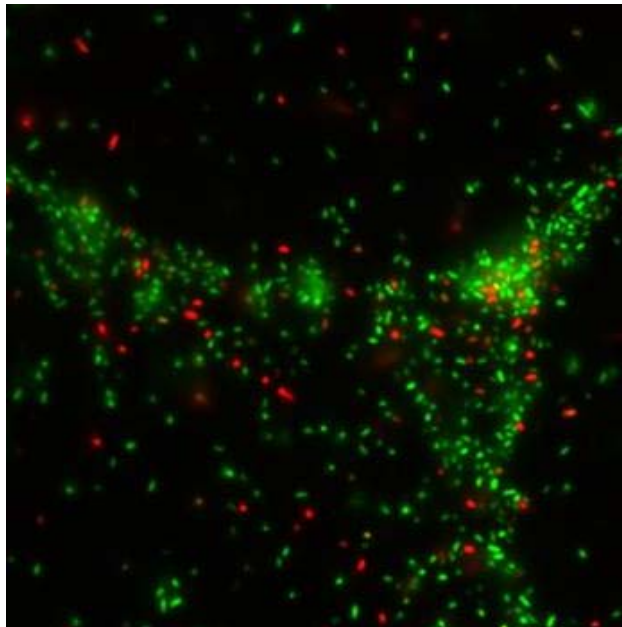
Skumdannelsens udvikling og slammets karakter er to indikatorer, som kan anvendes til at bedømme effekten af BC-100. Men ved samtidig at undersøge den fysiologiske effekt, som BC-100 har på Mycolata, er der muligt at få en større indsigt i, hvorfor skummets udbredelse og karakter forandres, samt at forklare de forandringer der ses i forhold til Ti, SVI osv.

4.3.1 Live/Dead staining

Live/dead staining (LDS) er en farvemethode, som anvendes til at detektere samt skelne levende og døde celler i komplekse miljøer såvel som renkulturer. I metoden benyttes to forskellige farvereagenser; SYTO9 og propidiumiodid, som farver cellernes nukleinsyrer forskelligt, afhængigt af om cellemembranen er intakt eller ej (Jin et al., 2005).

LDS-metoden tager udgangspunkt i, at alle levende celler har en intakt cellemembran, mens døde celler antages at have en delvist ødelagt cellemembran, som er let gennemtrængelig for forskellige stoffer. Når prøven tilsættes farvereagenserne, vil alle celler med intakt cellemembran såvel som ødelagt cellemembran tillade reagenset SYTO9 at trænge ind i cellen, mens kun en ødelagt cellemembran er permeabel for reagenset propidiumiodid. SYTO9 vil således farve nukleinsyrer i både levende og døde celler, mens propidiumiodid kun vil farve nukleinsyrer i døde celler (Jin et al., 2005).

De farvede celler undersøges efterfølgende i et fluorescensmikroskop, hvor farvningen med SYTO9 og propidiumiodid resulterer i hhv. grøn fluorescensfarvning af de levende bakterier, som kan ses ved 480-500 nm, og en rød fluorescensfarvning af døde bakterier, som kan ses ved 490-500 nm. Ved at anvende en bølgelængde på 490-500 nm er det muligt at observere begge farver samtidigt, hvilket fremgår af figur 7. I de døde celler vil propidiumiodid reducere effekten af SYTO9, således at det røde fluorescenssignal i døde celler vil overskygge den grønne fluorescensfarvning i disse celler (Jin et al., 2005).



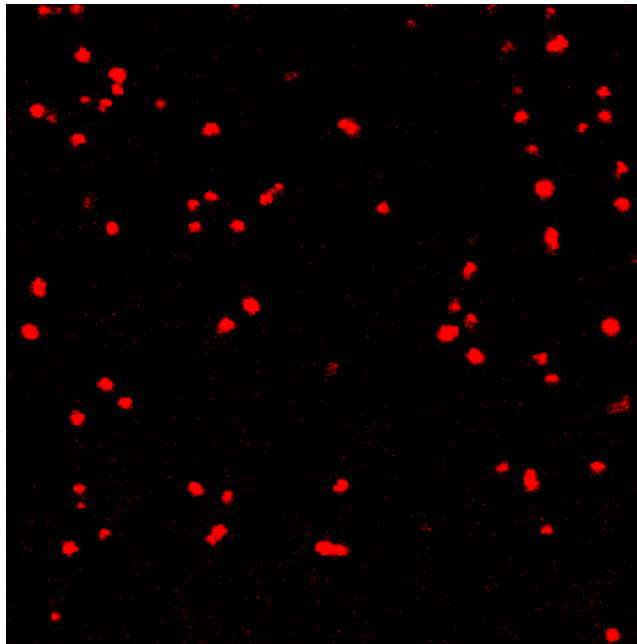
Figur 7: Billede af LDS-farvning taget ved en bølgelængde på 490-500 nm.

Før, under og efter doseringsforløbet blev der på aktiv-slam- og skumprøverne anvendt LDS. Andelen af levende Mycolata og flokbakterier blev undersøgt ved at blande celled suspension og LDS-opløsning i forholdet 1:1, og lade farvereagenserne virke i 15 min. Efterfølgende blev den farvede celled suspension filtreret ned på sorte 0,22 micron polycarbonat filtre, som blev skyllet igennem med en PBS-opløsning for at fjerne overskydende farve. Hvert filter blev forsigtigt overført til et objektglas, hvorpå der blev

lagt en dråbe citifluor og et dækglas. Disse præparater blev dernæst undersøgt i fluorescensmikroskop, hvorved andelen af døde celler blev bestemt. En mere detaljeret beskrivelse af metodens anvendelse findes i bilag 4.

4.3.2 Respirationsaktivitet målt med CTC

CTC er en metode, der benyttes til at bestemme, hvorvidt bakterierne er metabolisk aktive eller ej. Metoden bygger på, at aktive bakterier optager og reducerer en elektronacceptor - ofte ilt - i forbindelse med respirationsaktivitet. Metode benytter således 5-cyano-2,3-dietyl-tetrazoliumchlorid (CTC), som elektronacceptor, idet CTC reduceres gennem respirationselektrontransportkæden til tungtopløselige CTC-formazankrystaller (CTF). Når cellerne optager CTC og respirerer, vil CTC omdannes til CTF, som fluorescerer rødt i metabolisk aktive celler (Vollertsen et al., 2001), når de undersøges i et fluorescensmikroskop ved en bølgelængde på 450 nm (Polysciences Inc, 1999). Bakterier indeholdende fluorescerende CTF-krystaller ses af figur 8. Ved at kombinere CTC med lysmikroskopi og LDS er det muligt at bestemme det samlede antal bakterier samt hvor stor en del af bakterierne, der er både levende og aktive (Vollertsen et al., 2001).



Figur 8: Billede af fluorescerende CTC i cellerne.

Før doseringsforløbet blev der på aktiv-slam- og skumprøver fra Øster Hornum Renseanlæg anvendt CTC. Den aktive andel af Mycolata og flokbakterier blev undersøgt ved at fortynde celsesuspension med sterilfiltreret vand i forholdet 1:1 og dernæst tilsætte 5 μ L CTC-opløsning pr. mL fortyndet prøve og lade det inkubere i 30-60 min ved stuetemperatur. Efterfølgende blev 20 μ L af den farvede celsesuspension overført til hvert af de tre objektglas, hvorpå der blev lagt et dækglas. Disse præparater blev derpå undersøgt i fluorescensmikroskop for at bestemme andelen af aktive celler. En mere detaljeret beskrivelse af metodens anvendelse findes i bilag 5.

5. Effekten af dosering med BC-100 på Øster Hornum Renseanlæg

Dosering og behandlingsperiode med BC-100 afhænger af mængden og den biologiske tilstand af det aktive slam i anlægget samt slamalderen (Kemira Water, 2006), men doseringsforsøg har vist, at en standard behandlingsperiode på 10 uger er nødvendig for at komme skumproblemerne til livs. Selve doseringen baseres på slammængden i anlægget. Det anbefales at dosere BC-100 svarende til 0,5 vægtprocent polyamine polymer pr. kg MLSS i procestanken. For at opnå den optimale effekt af produktet bør der allerede i løbet af det første døgn i behandlingsforløbet doseres så meget BC-100 (100 ml BC-100/kgMLSS), at denne polyamine polymerkoncentration opnås (Nilsson & Eskilsson, 2007). På Øster Hornum Renseanlæg svarer dette til 0,25 g BC-100/L SS ved en slamkoncentration på 2,5 g SS/L. I de efterfølgende uger doseres der kun BC-100 svarende til den mængde polyamine polymer, der udtages med overskudslammet. Dette svarer til, at der for en slamalder på 10 dage doseres 10 % af doseringen på førstedagen. Når der i nogle uger er blevet doseret den lave dosering, anbefales det igen at dosere 100 ml BC-100/kgMLSS en enkelt dag. Efterfølgende anvendes den lave dosering i resten af behandlingsperioden (Nilsson & Eskilsson, 2007).

BC-100 doseres på væskeform for derved at opnå en nem håndtering af produktet samt en optimal opblanding i slammet. Væsken, som er gullig, har en pH på 5-7 og en densitet på 1140 kg/m³. Ifølge klassificeringen af produktet udgør BC-100 hverken en sundheds- eller miljømæssig trussel (Kemira Water, 2006).

5.1 Doseringsforløb

På Øster Hornum Renseanlæg blev doseringen af BC-100 påbegyndt 83 dage efter, at doseringen med PAX XL-342 blev stoppet. Der var på dette tidspunkt en kraftig skumdannelse i ringkanalen. Doseringen af BC-100 blev beregnet på baggrund af en slamkoncentration på 2,5 gSS/L i anlægget og en doseringsperiode på i alt 10 uger. I løbet af det første døgn blev der således doseret 111,6 L BC-100 for at opnå den rette polymerkoncentration i anlægget. For at kompensere for den stofmængde, der udtages med overskudsslammet, blev der i de efterfølgende 36 dage doseret 2,8 L BC-100/dag under beluftning. Dernæst blev den høje dosering gentaget en enkelt dag for efterfølgende at vende tilbage til den lave dosering. Efter 7 ugers dosering var der en doseringspause på 3 uger, som blev efterfulgt af 3 ugers dosering med 2,8 l BC-100/dag. En oversigt over doseringsforløbet ses af tabel 4.

Fra Øster Hornum Renseanlæg er der både før, under og efter doseringsforløbet blevet udtaget et par mL aktiv-slam og en skumprøve to gange om ugen, som blev sendt med posten til Aalborg Universitet. På prøveflaskerne er der fra renseanlægget side blevet noteret dato, SV og TS. Desuden er skummet udbredelse og karakter blevet beskrevet.

Tabel 4: Doseringsforløb på Øster Hornum Renseanlæg.

<i>Doseringsperiode</i>	<i>Antal dage</i>	<i>Dosering af BC-100</i>
Doseringsstart	1	111,6 L/dag
1. doseringsperiode	36	2,8 L/dag
Midtvejsdosering	1	111,6 L/dag
2. doseringsperiode	11	2,8 L/dag
Doseringspause	21	0 L/dag
3. doseringsperiode	21	2,8 L/dag
I alt	91	413,6 L

5.2 Indvirkning på skumdannelsen

7 uger efter doseringsstop med PAX-XL342 fandt en begyndende skumdannelse sted, som i ugerne efter tiltog støt. I starten var der således et skumlag på ca. 1 meters længde efter skumafskærmningen, men efter blot to uger var dette skumlag vokset til 5 meter i længden. Skumlaget dækkede ved doseringsforsøgets start et område svarende til ringkanalens bredde og 6 meter efter den ene skumafskærmning (se figur 10). Skumlaget var på dette tidspunkt 15 cm tykt. Skumlagets udbredelse før, under og efter doseringen med BC-100 fremgår af figur 9-13.

Doseringen med BC-100 havde straks en stor effekt på skumlagets udbredelse, idet skumlaget i løbet af den første uge blev reduceret til kun at være 2 meter langt men stadig lige så bredt som ringkanalen. Skummet blev samtidigt mørkere i farven samt mere vådt og tungt. I de efterfølgende 4 uger var skummets udbredelse nogenlunde stabil, idet skumlaget varierede mellem 2,5-3,5 meter (se figur 11). 5 uger efter doseringsstart med BC-100 fandt den høje midtvejsdosering sted, hvor der i løbet af et enkelt døgn igen blev doseret 111,6 L BC-100. Den høje dosering havde igen stor indvirkning på skumdannelsen, idet skumlagets længde i løbet af kun 2 uger blev reduceret til under 0,5 meter i længden og kun ca. 1 meter i bredden. Doseringen med BC-100 havde således en meget tydelig effekt på skummets udbredelse, men da doseringsforsøget blev stoppet 12 dage efter midtvejsdoseringen, tiltog skumdannelsen hurtigt igen. I løbet af doseringspausen på kun 21 dage voksede skumlaget til 4 meter i længden og til igen at være lige så bredt som ringkanalen. Til trods for at doseringen med BC-100 blev genoptaget, forblev skumlaget omkring dette niveau i 3. doseringsperiode (se figur 12). I doseringsforsøgets sidste uge var skumlaget endda vokset til 6-7 m, hvilket svarer til udgangspunktet for doseringsforsøget. I slutningen af doseringsforsøget begyndte personalet på Øster Hornum Renseanlæg at fjerne skumlaget, hvilket det sidste datapunkt i figur 13 viser.



Figur 9: Øster Hornum Renseanlæg før skumdannelsen (Bøgh, 2007).



Figur 10: Skumdannelse på anlægget ved doseringsstart (dag 83)

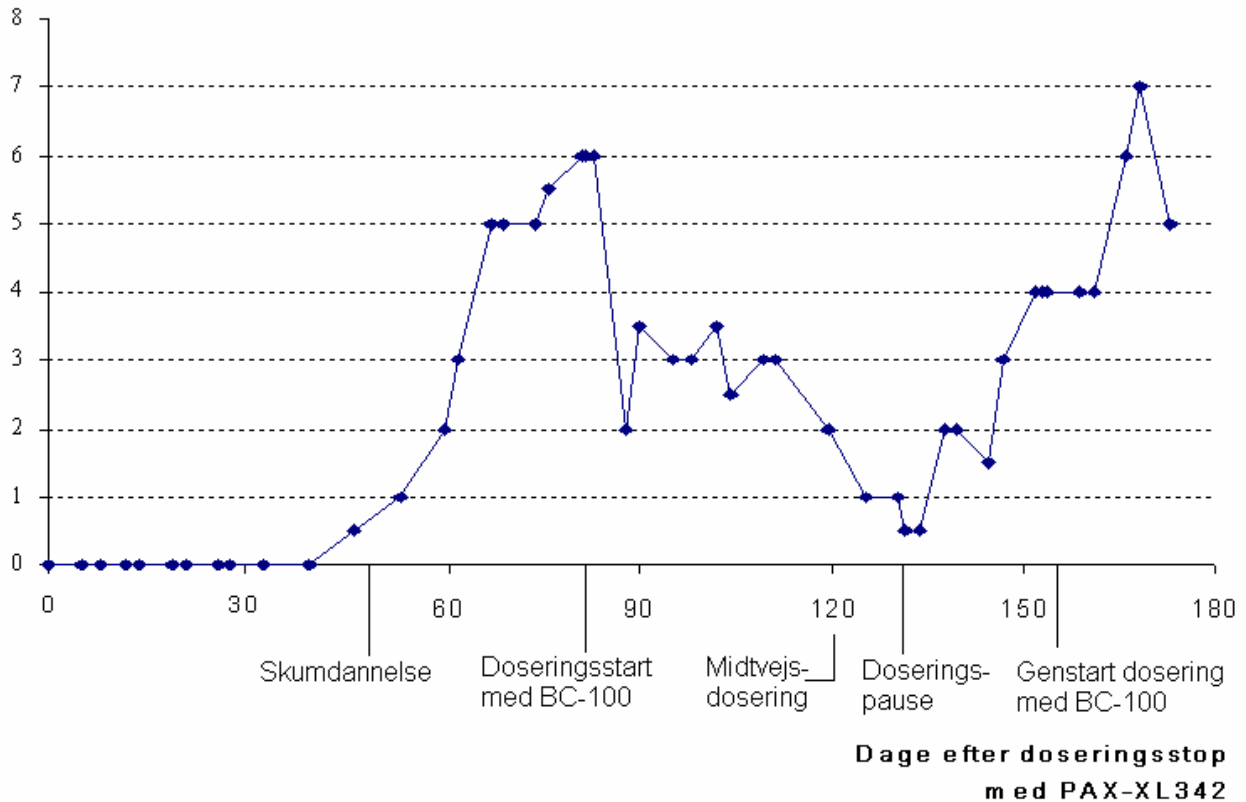


Figur 11: Skummets udbredelse efter 3 ugers dosering med BC-100 (dag 105)



Figur 12: Skummets udbredelse en uge inde i 3. doseringsperiode (dag 160)

Skumlagets
længde [m]



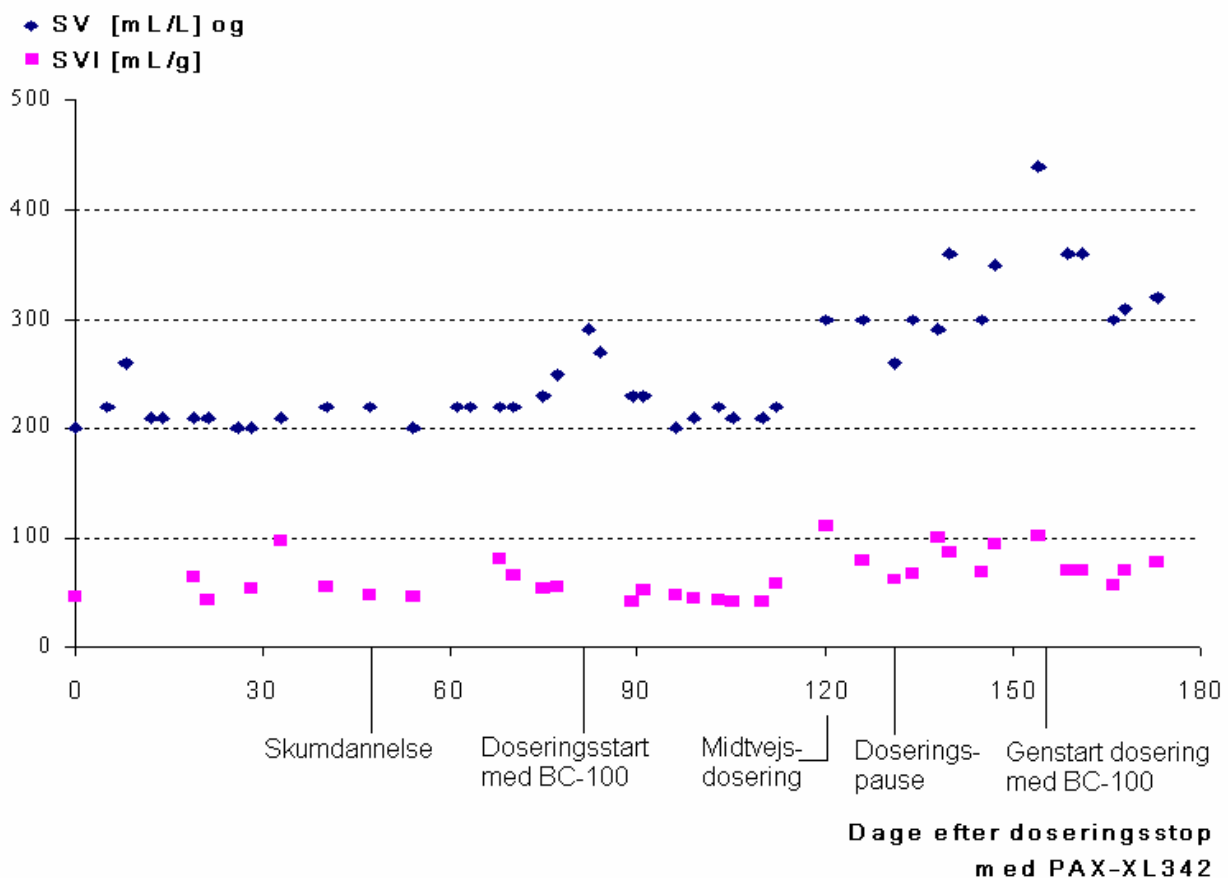
Figur 13: Skummets udbredelse fra doseringsstop med PAX XL-342 frem til og med dosering af BC-100

5.3 Indvirkning på bundfældningsegenskaber

Slammet fra Øster Hornum Renseanlæg bundfældede generelt hurtigt og efterlod en klar vandfase. Bedømt ud fra SVI havde slammet også generelt gode eller tilfredsstillende bundfældningsegenskaber, idet SVI lå under 100 mL/g (se figur 14). I doseringsforløbet lå SVI generelt stabilt omkring 50 mL/g helt frem til midtvejsdoseringen på dag 120. Efter denne høje dosering med BC-100 forekom der en let stigning af SVI, som indikerer, at bundfældningsegenskaberne blev lettere forringede i forhold til før midtvejsdoseringen. Dette hænger nok sammen med, at flokkene på dette tidspunkt var blevet meget små og som følge heraf bundfældede dårligere.

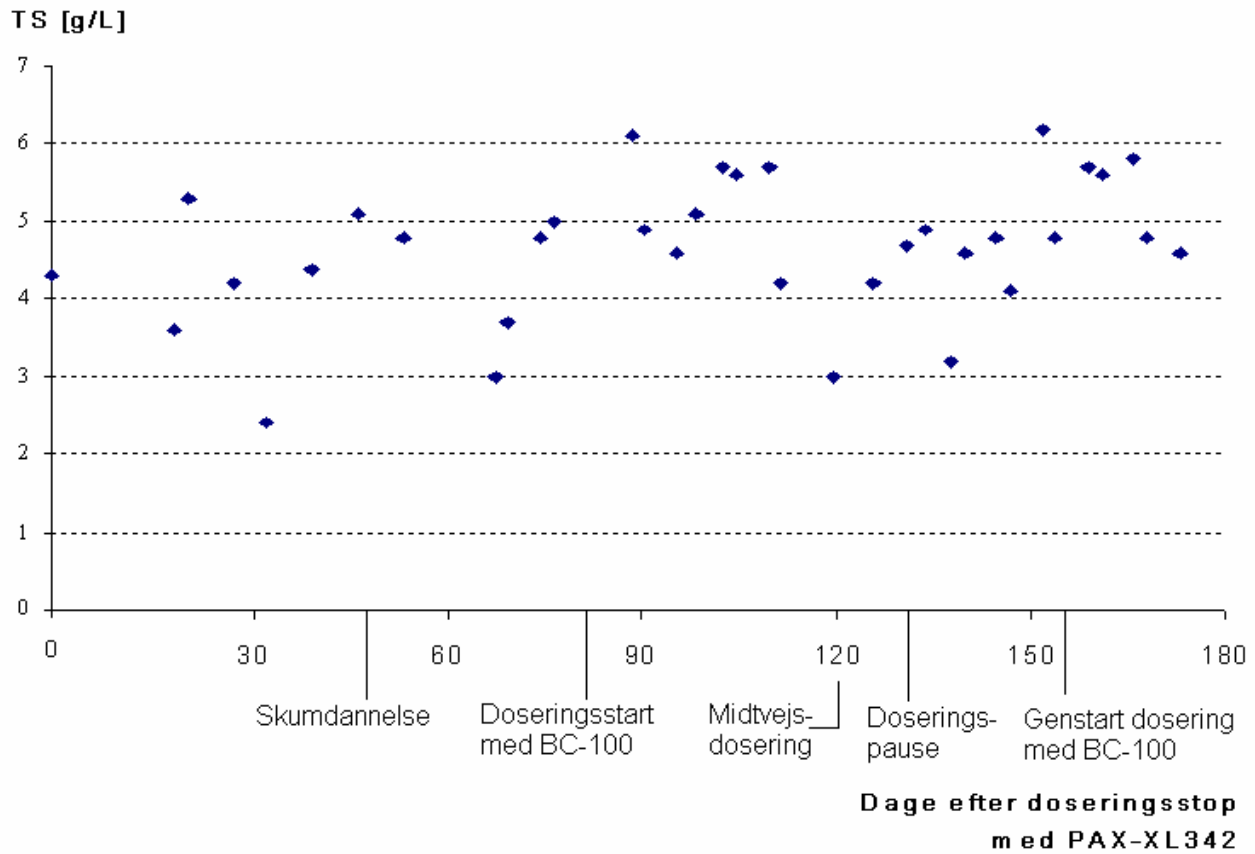
SV lå nogenlunde stabilt omkring 200-250 mL/L helt frem til ugerne før doseringsforsøgets start. På dette tidspunkt, hvor oplomstringen af Mycolata havde fundet sted, steg SV til 290 mL/L. I ugerne efter doseringsstart med BC-100 faldt SV igen, hvilket tyder på, at BC-100 har en positiv indvirkning på slamflokkenes tyngde, selvom dette ikke umiddelbart kan ses på SVI grundet manglende målinger. Ca. 2 uger efter doseringsstart skete der en stabilisering af SV, så det nu lå stabilt omkring 200-220 mL/L.

Da midtvejsdoseringen fandt sted på dag 120 skete der en stigning af SV, som formegentlig skyldes, at der er fundet en deflokkulering sted.



Figur 14: Udviklingen af SV og SVI fra doseringsstop med PAX XL-342 frem til og med dosering af BC-100

Tørstofmålingerne, som fremgår af figur 15, lå generelt mellem 2,4 g/L og 6,2 g/L som hhv. laveste og højeste værdi. Dette udsving synes rimeligt, da der er tale om et lille anlæg, hvor små forskelle i udledte vandmængder og slamudtag kan have relativ stor indflydelse på indholdet af tørstof. Der er dog tvivl om, i hvor stor grad disse TS-målinger er forbundet med fejlkilder, idet der undervejs er blevet observeret måleresultater, som lå udenfor den normale skala for sådanne målinger. Disse data er således ikke medtaget i figuren. Det data som fremgår af figur 15 forventes kun at være behæftet med en eller flere systematiske fejl, som således har påvirket datamængden generelt, og derfor ikke som sådan har indflydelse på forholdet mellem de forskellige målinger.



Figur 15: Udviklingen af TS fra doseringsstop med PAX XL-342 frem til og med dosering af BC-100.

5.4 Mikroskopering af aktiv-slamm og skum

5.4.1 Karakterisering af slammet før dosering med BC-100

I de første 5 uger efter at doseringen med PAX-XL342 blev stoppet, skete der kun relativt få ændringer med aktiv-slamm. Generelt lå TI på 1,5-2, og den altdominerende tråd var morfologisk set Type 0041/0675, mens andre tråde med påvækster - herunder Type 1851 - fandtes i et sekundært omfang. Langt hovedparten af trådene var lange, tynde, let buede og buede tråde med påvækster, som befandt sig inde i flokkene, hvorfra de stak ud. Men der fandtes desuden en del andre tråde med påvækster, som varierede både i længde og tykkelse. Størstedelen dannede rygsøjlen i flokkene, men en del af trådene med påvækster befandt sig ligeledes i bundter mellem flokkene.

Slamflokkene, som generelt var faste og kompakte i strukturen, havde en irregulær til rund flokform og varierende i størrelse (0,15-0,5 mm). De fleste flokke var dog rimelig store. Trådene havde kun en meget begrænset negativ indvirkning på flokstrukturen, idet de enkelte steder dannede bro mellem flokkene og i få tilfælde tilmed skabte en delvis åben flokstruktur. Betydningen og omfanget af denne brodannelse syntes dog begrænset og var således ikke et mærkbart problem på dette tidspunkt.

6 uger efter doseringsstop med PAX-XL342 blev der for første gang observeret trådformede bakterier, der ud fra morfologien kunne identificeres som Mycolata. På dette tidspunkt var trådene med påvækster dog stadig dominerende, mens Mycolata kun var sekundær.

I den 7. uge skete der en opblomstring af Mycolata, som for alvor satte gang i skumdannelsen. Under denne opblomstring, var Mycolata tydeligvis dominerende, mens Type 0041/0675 var sekundær. I de efterfølgende slamprøver blev Type 0041/0675 dog igen dominerende. Dette skyldes nok, at Mycolata efter opblomstringen er søgt væk fra vandfasen og op i skumlaget, hvor udbredelsen er fortsat.

5.4.2 Identifikation af trådformede bakterier

Da der ud fra morfologi første gang blev identificeret Mycolata i prøverne fra Øster Hornum Renseanlæg, blev der ligeledes lavet FISH-analyse på slamprøven for at identificere de forgrenede filamenter. Prøven var positiv for EUB-mix og Myc-657 men negativ for både GOR-596 og Spin-1449. Det kunne ud fra disse resultater således kun konkluderes, at filamenterne tilhørte gruppen Mycolata, men det er uvist, hvilke specifikke arter der er tale om. Resultaterne fremgår af tabel 5.

Tabel 5: Resultater for identifikation af Mycolata

	Alle bakterier (EUB-mix)	Mycolata (Myc-657)	Skermania (Spin-1449)	Gordonia (GOR-596)
Identifikation af Mycolata	+	+	÷	÷

Aktiv-slammet fra Øster Hornum Renseanlæg viste sig som nævnt at indeholde mange tråde med påvækster, som ud fra morfologien bl.a. blev identificeret som Type 0041/0675. Disse trådformede bakterier siges oftest at tilhøre gruppen *Chloroflexi*, men dette er ikke altid tilfældet. Trådformede bakterier af denne type kan også tilhøre gruppen *Aquaspirillum* og TM7. Til identifikation af Type 0041/0675 og lignende tråde blev der anvendt tre gruppespecifikke prober. Den generelle probe EUB-mix fungerede som reference:

- EUB-mix – der har til formål at ramme alle bakterier
- Cfx-mix – der rammer *Chloroflexi*
- Floc-997 – der rammer *Aquaspirillum*
- TM7 – der rammer TM7

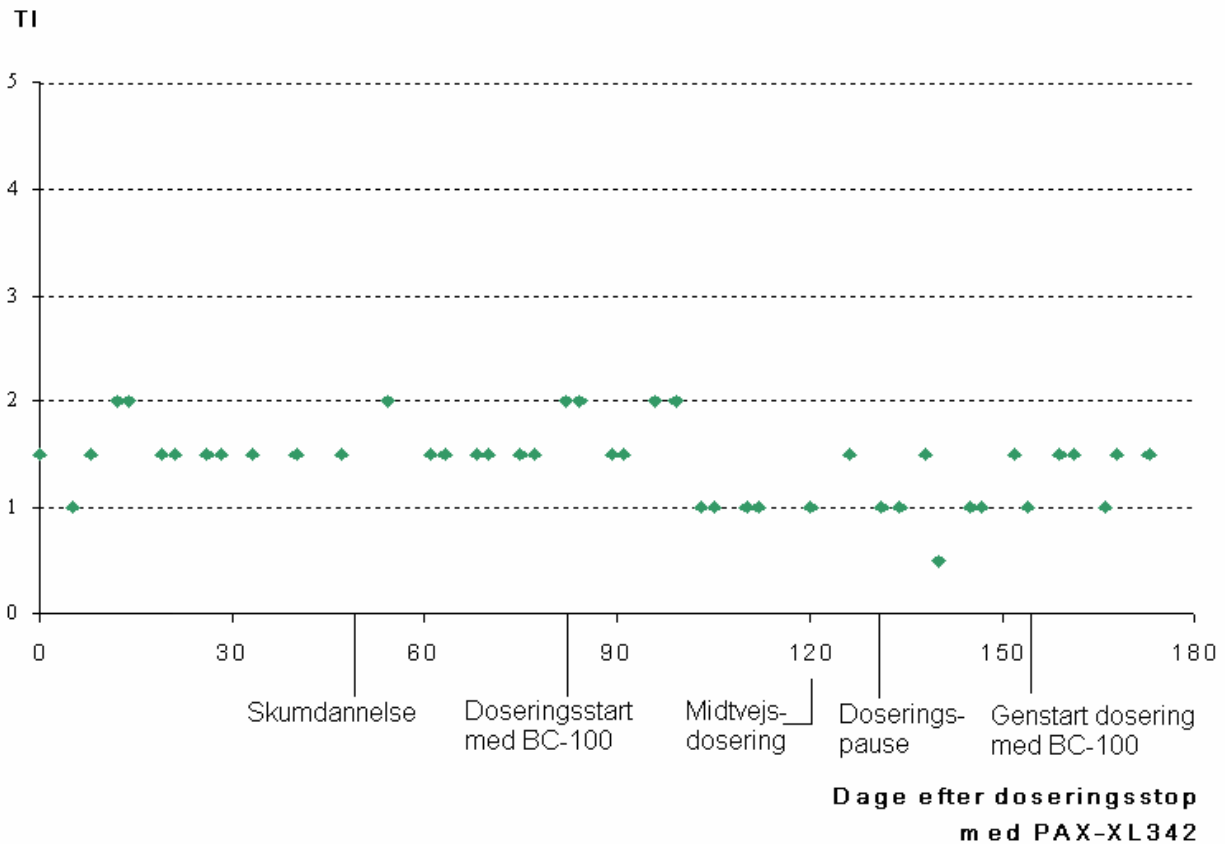
Prøven var som forventet positiv for EUB-mix, mens trådene med påvækster viste sig at tilhøre hhv. *Chloroflexi* og *Aquaspirillum*. Omkring 2/3 af trådene med påvækster tilhørte således gruppen *Chloroflexi*, mens ca. 1/3 tilhørte gruppen *Aquaspirillum*. Prøven var ikke positiv for TM7, hvilket tyder på, at hverken Type 0041/0675 eller lignende tråde tilhørte denne gruppe. Resultaterne fremgår af tabel 6.

Tabel 6: Resultater for identifikation af Type 0041/0675

	Alle bakterier (EUB-mix)	Chloroflexi (Cfx-mix)	Aquaspirillum (Floc-997)	TM7 (TM7-905)
Identifikation af Type 0041/0675	+	+	+	-

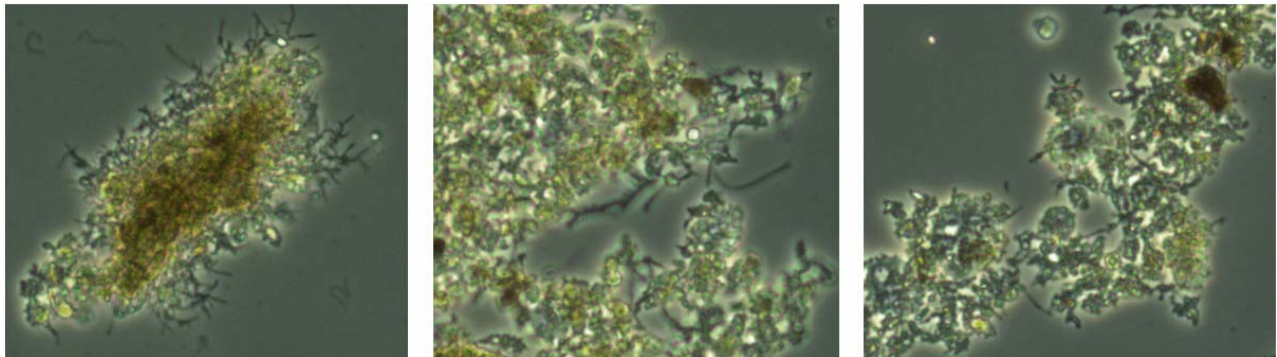
5.4.3 Effekten af dosering med BC-100

På trods af opblomstringen af Mycolata lå TI konstant på 1,5-2 helt frem til doseringsforsøgets start. TI skyldes således primært tilstedeværelsen af Type 0041/0675, idet Mycolata oftest gemte sig i slamflokkene og derfor kun havde en meget begrænset indvirkning på TI. Andelen af Type 0041/0675 forsvandt efter en måneds dosering med BC-100, hvilket gjorde at TI faldt til 1, hvor der blev resten af doseringsperioden (se figur 16).



Figur 16: Udviklingen af TI fra doseringsstop med PAX XL-342 frem til og med dosering med BC-100.

Selvom Mycolata ikke påvirkede slamflokkene ved at skabe brodannelse, havde disse tråde alligevel en indvirkning på flokkenes struktur. Dette skyldes, at Mycolatas grenede morfologi nogle steder åbnede flokkene, så de blev mere diffuse i strukturen. Dette var især tilfældet yderst i en del af flokkene. I de fleste flokke var flokstrukturen stadig kompakt i ugerne op til doseringsforsøgets start, men dette ændrede sig især først i 1. doseringsperiode, hvor flokkene blev mere diffuse at se på. Lige efter midtvejsdoseringen syntes flokkenes tilstand dog forværret, idet mange flokke på dette tidspunkt var meget åbne og 'slimede' (se figur 17).



Figur 17: Flokke med Mycolata. Før doseringen med BC-100 var flokkene endnu kompakte trods tilstedeværelsen af Mycolata (tv), men i 1. og 2. doseringsperiode blev flokkene mere åbne og diffuse (hhv. i midten og tv.).

I takt med at omfanget af Type 0041/0675 tog til i ugerne op til doseringsforsøgets start, tiltog også brodannelsen, og flokkene blev mere irregulære, men samtidig skabte de trådformede bakterier med påvækster ligeledes grundlag for dannelsen af mange store flokke. I løbet af 1. doseringsperiode forsvandt mange af disse tråde, hvilket bevirkede, at slamflokkene blev rundere. Men efterhånden som doseringen fortsatte, bevirkede det lille omfang af tråde også, at flokkene ikke længere blev holdt så godt sammen. Dette resulterede i, at der blev færre store flokke og langt flere små og åbne flokke.

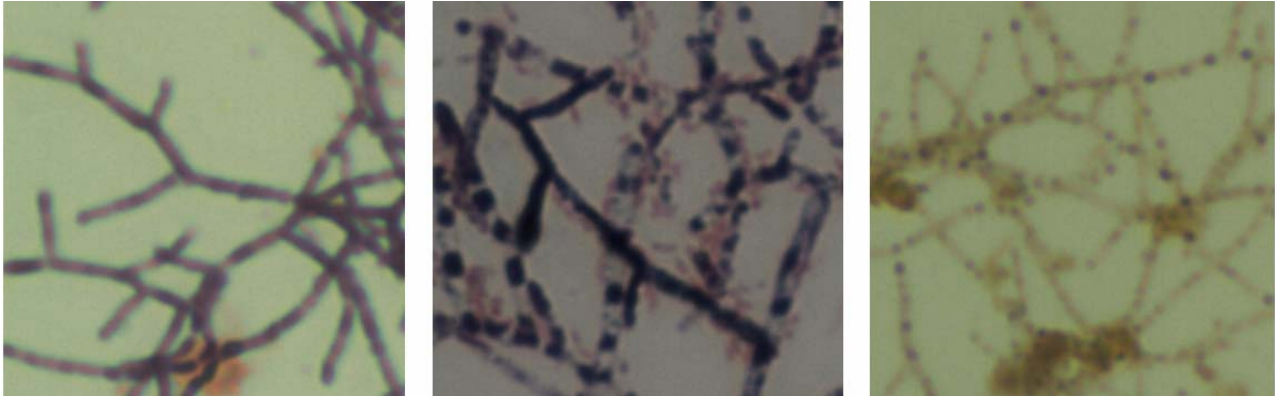
I løbet af doseringspausen og den 3. doseringsperiode syntes slamflokkenes tilstand at være forbedret. Flokkene var på dette tidspunkt igen mere 'samlede' og kompakte i strukturen, men der var stadig en del 'slim'-dannelse. Omfanget af Mycolata og Type 0041/0675 tog også lidt til på dette tidspunkt, men dette havde kun begrænset indflydelse på det samlede TI.

I løbet af doseringsforløbet var der oftest kun få Mycolate i vandfasen mellem flokkene, men i enkelte prøver blev der observeret en del, hvilket ikke umiddelbart kunne sættes i sammenhænge med doseringsforløbet. Andelen af frie celler var dog stort lige efter midtvejsdoseringen, hvilket kunne tyde på forgiftning.

Det dannede skumlag bestod næsten udelukkende af Mycolata og meget små slamflokke samt uorganiske partikler.

5.4.4 Gram- og Neisserfarvninger

Generelt var Mycolata tydeligt Gram positiv, men fra omkring en uge inde i doseringsforløbet blev der observeret en ændring i Gramfarvningen af Mycolata. Selvom den overvejende del af Mycolata stadig var Gram positive (ca. 75 %), farvede de resterende Mycolata-kolonier ikke fuldstændigt Gram positivt. I en del kolonier var forgreningerne i stedet kun pletvis Gram positive. Dette tyder på, at cellevæggen i disse celler har taget skade. Efter doseringspausen og i den efterfølgende 3. doseringsperiode farvede alle Mycolata igen Gram positiv.



Figur 18: Mycolata som Gram positiv (tv.), delvis Gram positiv (i midten) og Neisser positiv med granuler (th.).

Neisserfarvningen af Mycolata viste, at den pågældende art var Neisser positiv med granuler. Størrelsen og omfanget af disse granuler varierede meget både i perioden op til doseringen med BC-100 og under selve doseringen. Der var dog ikke nogen umiddelbar sammenhæng mellem doseringen af BC-100 og størrelsen eller omfanget af granuler i cellerne. Billeder af Gram- og Neisserfarvningen ses i figur 18.

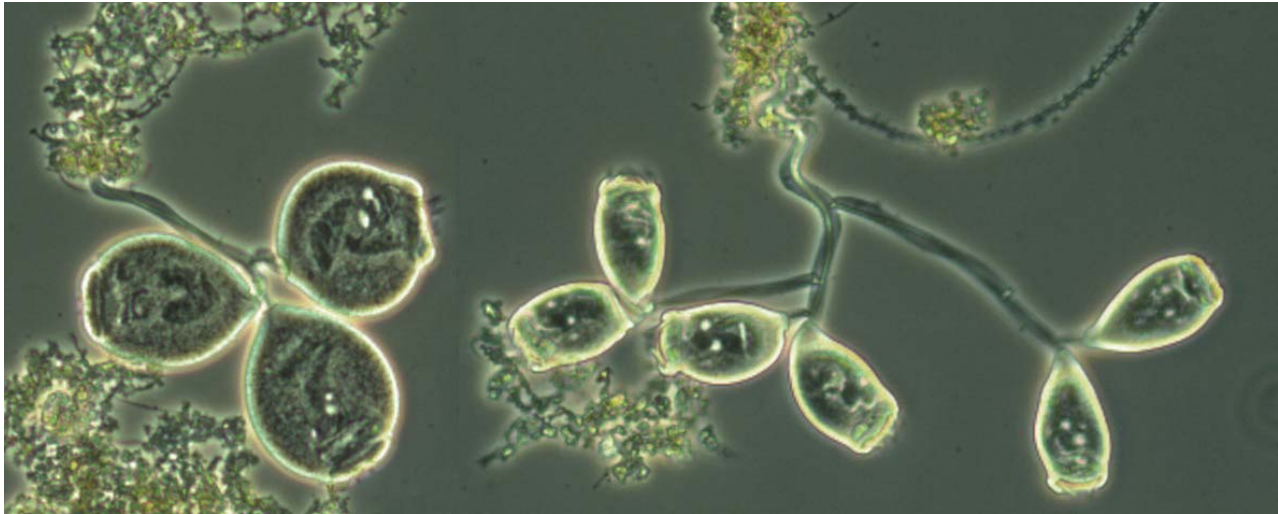
Type 0041/0675 og lignende tråde var Gram variable men primært Gram og Neisser negative. Dette ændrede sig ikke under doseringsforløbet.

5.4.5 Dyr, frie celler og partikler

Der var før skumdannelsen mange dyr tilstede i slammet og en rimelig stor diversitet. Der fandtes generelt en hel del flagellater, flere typer klokkedyr (se figur 19) og forskellige kravlende og fritlevende ciliater (især *Aspidisca spp.*) samt en del hjuldyr. Desuden blev der i flere prøver ligeledes observeret få bjørnedyr og børsteorme (*Acleosoma spp.* og *Nais spp.*), der græssede på slamflokkene. Omfanget af amøber (især Heliozoa) og forgrenede svampe varierede en del fra uge til uge.

I takt med at omfanget af Mycolata blev større svandt dyrelivet ind til kun at omfatte en hel del flagellater inde i flokkene, enkelte fritlevende ciliater og en del klokkedyr. Til gengæld skete der samtidig med Mycolata en opblomstring af amøber (Heliozoa) i både slammet og skummet. Under doseringen med BC-100 blev omfanget og diversiteten af dyr i slammet større og nåede således op på det niveau, der sås før opblomstringen af

Mycolata. Lige efter midtvejsdoseringen var der dog igen et fald i antallet af dyr i prøven, men dette vendte igen lige før doseringspausen.



Figur 19: Forskellige klokke-dyr i aktiv-slam fra Øster Hornum.

Før skumdannelsen var omfanget af frie celler i aktiv-slammet lille til almindeligt, men dette steg i takt med, at omfanget af Mycolata tiltog. Trods doseringen med BC-100 forblev der mange frie celler i slamprøverne. Der var generelt få spirochaeter samt rigtig mange organiske og uorganiske partikler i slammet både før og under doseringsforsøget.

5.5 Fysiologisk effekt på Mycolata ved dosering af BC-100

5.5.1 Indvirkning på Mycolatas overlevelse

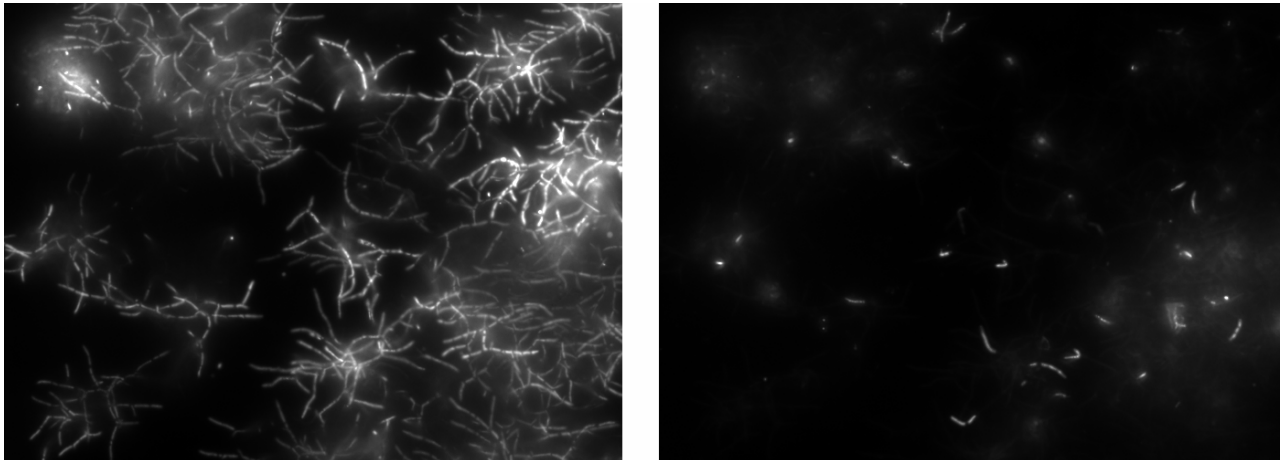
For at bestemme andelen af levende Mycolata og flokbakterier blev der før, under og efter hele doseringsforløbet anvendt LDS på slam- og skumprøverne fra Øster Hornum Renseanlæg. Da det blev observeret, at BC-100 tilsyneladende også havde en effekt på Type 0041/0675 (*Chloroflexi*), blev overlevelsen af disse bakterier ligeledes undersøgt. I tabel 7 ses en oversigt over resultaterne, som i det følgende er beskrevet nærmere.

Tabel 7: Bakteriernes overlevelsesgrad før, under og efter doseringen med BC-100

	<i>Mycolata i slam</i>	<i>Mycolata i skum</i>	Type 0041/0675	Flokbakterier
Før dosering med BC-100	+++	+++	ID	+++
1. doseringsperiode	++	+++	-	++
Midtvejsdosering	++	ID	-	++
2. doseringsperiode	++	++	-	++
Doseringspause	+++	+++	+	+++
3. doseringsperiode	+++	+++	+	+++

ID: ingen data, -: Få levende, +: lille del levende, ++: halvdelen levende, +++: Størstedelen levende, *Der var kun få *Chloroflexi*.

Før doseringen med BC-100 var 5-10 % af Mycolata døde i slammet (figur 20), mens kun 10 % var døde i skummet. Det var umiddelbart tilfældigt, hvor de døde celler befandt sig, idet der typisk blev observeret spredte døde enkeltceller og ingen hele døde forgreninger. Omkring 15 % af flokbakterierne var døde, og der var mange levende enkeltceller og små Mycolata-kolonier i vandfasen mellem flokkene. Disse frie celler var tydeligvis mere udsatte, idet 20-25 % af dem var døde.



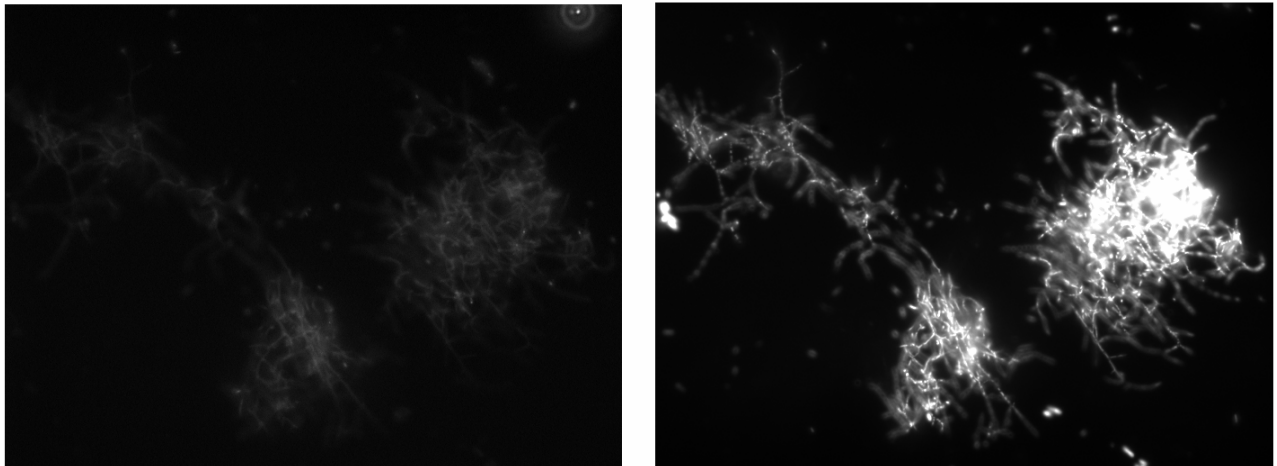
Figur 20: Intensitetsbilleder af hhv. grøn (tv.) og rød (th.) fluorescens, som viser andelen af hhv. levende og døde Mycolata i slammet før doseringen med BC-100

I slam- og skumprøverne, som blev udtaget dagen efter den høje startdosering, var mange af de Type 0041/0675, som stak ud fra flokkene, helt døde, og det samme var tilfældet for mange af de frie celler og små Mycolatakolonier i vandfasen. Men Mycolata var tydeligvis langt mere hårdføre over for BC-100 end de øvrige tråde og flokbakterier, idet der sås mange eksempler på døde Type 0041/0675, der stak ud af flokkene ved siden af levende Mycolata. Efter en uges dosering var også kun 20 % af de Mycolata, der stak ud fra flokkene eller lå frit i vandfasen, døde. Dette tal steg dog til 50 % i løbet af 1. doseringsperiode, men i modsætning til de øvrige tråde var der på dette tidspunkt stadig Mycolata-kolonier frit i vandfasen, som var 90-100 % levende. Generelt var kun 20 % af Mycolata i og omkring slamflokkene døde, mens kun omkring 15 % af Mycolata i skummet var døde.

Det lader til, at BC-100 havde en stor effekt på Type 0041/0675 (*Chloroflexi*), da omkring 75 % af disse tråde var døde allerede i løbet af den første doseringsuge. Især de tråde, som stak ud og dannede bro mellem flokkene, syntes at være påvirkede, idet 90 % af disse tråde var helt eller delvist døde. I løbet af 1. doseringsperiode blev antallet af Type 0041/0675 væsentligt reduceret, hvilket mange steder bevirkede, at flokkene blev rundere. De tråde med påvækster, der var tilbage i slammet, var stort set alle døde. Mange af påvæksterne på Type 0041/0675 var ligeledes døde, men der var stadig en del levende påvækster og flokbakterier omkring tråden, selvom selve tråden var død. Type 0041/0675 klarede sig bedre i skummet, da op mod 50 % af dem stadig var levende her. Der forekom tillige hele levende tråde i skummet, hvilket ikke var tilfældet i slammet. Dette er ikke overraskende, da BC-100 kun blev doseret direkte til slammet og dermed ikke kom i umiddelbar kontakt med bakterierne i skumlaget.

Desværre påvirkede doseringen af BC-100 ikke kun de trådformede bakterier med påvækster, idet omkring halvdelen af flokbakterierne ligeledes døde. Det virkede samtidig som om, flokkene som helhed blev mere diffuse og permeable i løbet af 1. doseringsperiode. Dette kan have gjort dem endnu mere påvirkelige overfor BC-100. En stor del af flokbakterierne i de diffuse flokke var således døde og efterlod de tilbageværende levende bakterier endnu mere udsatte. Især bakterierne i kanten af flokkene var døde, men også mange af flokbakterierne inderst i flokkene var døde. Andelen af levende bakterier var langt større i de relativt få flokke, som endnu var tætte og kompakte.

Den høje midtvejsdosering havde generelt en stor indvirkning på alle bakterierne i slammet. I dagene efter doseringen så det ud til, at stort set alle Mycolata var døde (figur 21). Dette gjaldt også enkeltceller og forgreninger af Mycolata i vandfasen. Mere end 50 % af flokbakterierne i de diffuse flokke var også døde. Der var stadig kun meget få Type 0041/0675 tilstede i slammet, og disse var ligeledes døde.



Figur 21: Intensitetsbilleder af hhv. grøn (tv.) og rød (th.) fluorescens, som viser andelen af hhv. levende og døde Mycolata i slammet få dage efter midtvejsdoseringen

I 2. doseringsperiode var der i vandfasen primært små enkeltceller og langt færre forgreninger af Mycolata end set tidligere. Generelt var cellerne i vandfasen 100 % døde, mens kun 50-55 % af Mycolata i slammet samlet set var døde. Mycolata lå nogle steder i bundter, og her var det hele kolonier, som enten var levende eller døde. I nogle kolonier var det kun spidsen af forgreningerne der var døde. Dette er positivt, da Mycolata vokser fra spidsen og ud. I skummet var 35-50 % af Mycolata døde.

De døde flokbakterier, som i løbet af 2. doseringsperiode udgjorde 40 %, befandt sig stadig i hele flokken – både yderst i kanten og inderst i kernen af flokkene. Dog var der en tendens til, at kantbakterierne var helt døde, mens en mindre del var døde inderst i flokkene. Flokkene var generelt stadig meget diffuse uanset størrelse, men de irregulære og langstrakte flokke syntes mest udsatte.

På baggrund af flokkenes tilstand blev det vurderet, at holde en pause med doseringen af BC-100 kun 11 dage efter den høje midtvejsdosering. I de 3 uger, som pausen varede, blev der således ikke doseret nogen form for kontrolkemikalie i anlægget. I løbet af doseringspausen så det ud til, at både Mycolata, flokbakterierne og Type 0041/0675 var ved at komme sig. Umiddelbart blev der kun observeret få døde Mycolata i slammet lige efter doseringspausen, og i skummet var langt størstedelen af Mycolata også levende. Kun enkelte celler eller små forgreninger var døde. Disse døde celler, som lå meget spredt, udgjorde kun omkring 10 %. Omfanget af tråde med påvækster var stadig lille, men der blev efter doseringspausen observeret enkelte levende tråde.

Det var også tydeligt at flokkene fik det bedre, idet der var nu kun 10-20 % døde sammenlignet med ca. 50 % før doseringspausen. De fleste celler i flokkene, som endnu var døde efter doseringspausen, var stav- eller kugleformede og forholdsvis store sammenlignet med de øvrige flokbakterier. Selvom en del flokke tilmed syntes mere kompakte, var det stadig tydeligt, at der var meget slim eller lignende i de fleste flokke. Både den levende og døde fraktion var meget lille og cellerne lå meget spredte i flokkene. På baggrund heraf må selve cellekoncentrationen i flokkene derfor også være reduceret i forhold til i starten af forsøget. De fleste frie celler i vandfasen mellem flokkene var også levende.

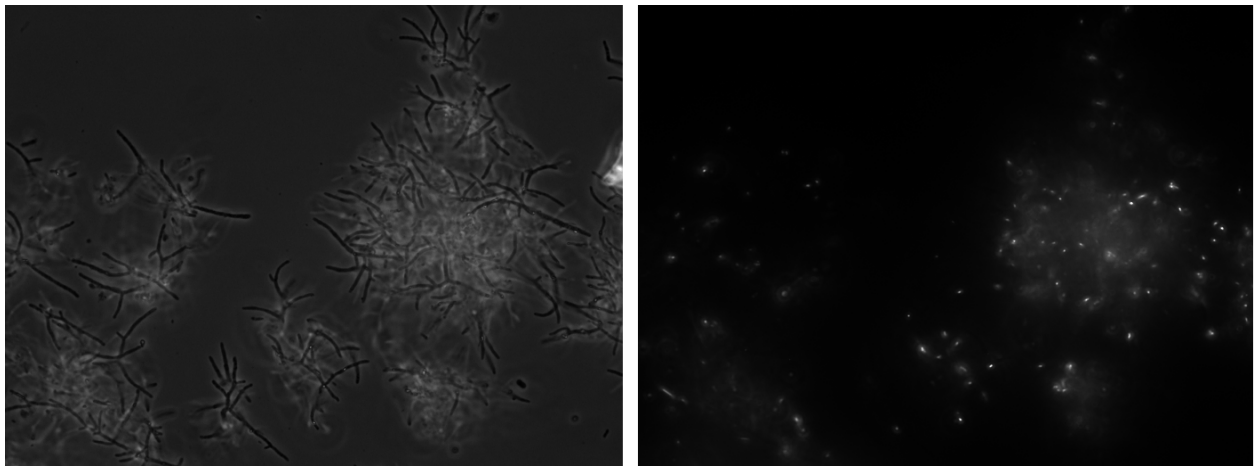
Den 3. doseringsperiode blev ikke startet med en høj dosering, hvilket tilsyneladende bevirkede, at bakterierne generelt ikke blev lige så påvirkede. Alt i alt var kun 10-15 % af Mycolata døde. Dette gjaldt både de kolonier, der befandt sig inde i flokkene og ude i vandfasen. Der var endog døde Mycolata inde i flokke, hvor mere end 50 % af flokbakterierne var levende. Kun ca. 10-15 % af Mycolata i skumlaget var døde. Disse døde celler var typisk spredte enkeltceller og ikke hele forgreninger eller kolonier. Mange steder var det cellerne yderst i forgreningerne, der var døde, men der blev ligeledes observeret nogle helt døde kolonier.

Doseringen af BC-100 i 3. doseringsperiode syntes heller ikke at påvirke flokbakterierne så voldsomt. Flokkene var i denne periode mere kompakte, og kun ca. 15-20 % af flokbakterierne var døde i de fleste flokke. I nogle flokke var der dog stadig op mod 40 % døde fordelt både yderst og inderst i flokkene. Generelt var 50-60 % af Type 0041/0675 døde i starten af 3. doseringsperiode, men efter 2 uger med den lave dosering begyndte de at komme sig. Da doseringsforsøget sluttede, udgjorde de døde Type 0041/0675 kun omkring 20 %. De levende tråde lå typisk meget sammenkrøllede inde i eller tæt mellem flokkene og havde kun få eller ingen påvækster. Der sås kun få døde påvækster på disse levende tråde.

I forbindelse med LDS var der flere gange problemer med baggrundsstøj, hvilket nogle gange gjorde det svært at bedømme det præcise omfang af levende og døde bakterier. Desuden var der stor forskel på det røde og det grønne fluorescenssignal, idet det røde var langt kraftigere end det grønne. Dette var vigtigt at have for øje, således andelen af døde celler ikke blev overestimeret.

5.5.2 Observeret respirationsaktivitet

Der blev før doseringen af BC-100 anvendt CTC på aktiv-slam- og skumprøver fra begge renselanlæg, men dette gav ikke det forventede resultat. Når de farvede præparater blev observeret i fluorescensmikroskop, var det kun de celler, der lå uden på Mycolata-kolonierne, som var aktive (se figur 22). De tilsvarende prøver, som blev undersøgt vha. LDS, bekræftede, at over 90 % af Mycolata var levende i de pågældende prøver. Det var derfor også forventeligt, at en stor del af Mycolata ligeledes måtte være aktive. Da dette ikke var tilfældet, lader det i stedet til, at CTC ikke kan trænge igennem cellevæggen på Mycolata. På baggrund af disse resultater vurderes det derfor, at CTC ikke kan benyttes til at bestemme, hvorvidt Mycolata er aktiv. Metoden er derfor heller ikke yderligere blevet anvendt i forbindelse med dette projekt.



Figur 22: Lysmikroskopibillede af skum (tv.), som viser alle celler, og det tilsvarende intensitetsbillede af rød fluorescens (th.), som viser aktive celler. Ved sammenligning af de to billeder ses det, at kun en meget lille andel af det samlede antal celler er aktive. De aktive celler er ikke en del af Mycolata-filamenterne.

5.6 Diskussion

5.6.1 Skumdannelsen

Selvom det ikke altid kunne ses på overlevelsesgraden af Mycolata i slammet og skummet, var virkningen af BC-100 tydelig: Skumdannelsen blev væsentligt reduceret under doseringsforløbet. I sær 1. og 2. doseringsperiode viste tydeligt, at doseringen med BC-100 påvirkede bakterierne og dermed skumdannelsen. Samtidig viste forsøget, at skumlaget tiltog kraftigt under doseringspausen, hvilket underbygger at BC-100 havde en kontrollerende effekt på Mycolata. I den 3. doseringsperiode var effekten dog langt mindre, hvilket tyder på, at en høj startdosering er nødvendig for at komme problemerne til livs.

I prøverne var det tydeligt at langt størstedelen af Mycolata befandt sig i skummet og ikke i slammet. I skummet klarede Mycolata sig tilmed bedre, idet andelen af døde oftest var lidt lavere her i forhold til i aktiv-slammet. Ved løbende at fjerne skumlaget, formodes det derfor, at effekten af BC-100 ville kunne ses endnu hurtigere, og herved kunne en ny skumdannelse efter endt dosering måske også udskydes. Dosering af BC-100 direkte til

skummet vha. et sprinklersystem er ligeledes en mulighed for at komme problemerne hurtigere til livs. Dette ville trække en del af skumlaget ned i slammet, hvor Mycolata lettere kunne kontrolleres (se desuden kapitel 7).

5.6.2 *Mycolata*

Det er i tidligere studier blevet observeret, at BC-100 kun virker på de arter, der er positive for Mycolata-proben (Bøgh pers. kom., 2007). Derfor var det vigtigt, at få identificeret disse bakterier. De skumdannende trådformede bakterier blev ud fra morfologi og genprober identificeret som bakterier tilhørende gruppen Mycolata, men det var ikke muligt, at fastslå hvilke arter der var tale om. Det vides således heller ikke hvilke præcis, hvilken type Mycolata BC-100 er blevet testet på i dette casestudie.

BC-100 havde størst effekt på Mycolata, der stak ud fra flokkene eller lå i vandfasen mellem flokkene. Dette kunne tyde på, at flokkene ikke er så permeable overfor BC-100 som først antaget. Måden hvorpå Mycolata døde, var umiddelbar meget varierende. Der blev observeret få døde Mycolata i spidsen eller midt i forgreningerne. Men der forekom også hele døde forgreninger og ligeledes hele døde kolonier, som tilmed lå i bundter med helt levende kolonier. De fleste døde Mycolata forekom dog som tilfældigt spredte døde filamentstykker i større kolonier.

I perioder sås der mange frie Mycolata-kolonier i vandfasen, hvilket kan skyldes, at anlægtspasseren i starten af forløbet af og til lod skummet cirkulere i ringkanalen under beluftning. Dette kan have trukket Mycolata med ned i slammet, hvorfor omfanget af dem i vandfasen dermed har syntes større end det egentligt var tilfældet. Generelt var det også svært at bedømme omfanget af Mycolata i slammet, fordi disse bakterier kan have varierende morfologi i de forskellige vækststadier. Dette gjorde det til tider svært at skelne Mycolata fra de øvrige bakterier i flokkene. Den varierende morfologi var i sær tydelig i forbindelse med FISH-analysen, hvor aflange stavformede enkeltceller i flokkene gav et positivt signal for Mycolata-proben. Dette blev oftere observeret end hele forgreninger med positivt signal.

Gramfarvningerne af Mycolata viste, at bakteriernes cellevæg ændrede sig under doseringsforløbet, hvilket også tyder på, at bakterierne tog skade af doseringen med BC-100.

Antallet og diversiteten af dyr syntes at ændre sig afhængigt af udbredelsen af Mycolata. I de perioder, hvor der var mange Mycolata i aktiv-slammet, blev der typisk observeret færre dyr end det var tilfældet i de perioder, hvor udbredelsen af Mycolata var mindre markant. Dette kunne tyde på, at Mycolata måske har en negativ virkning på diversiteten i aktiv-slammet.

5.6.3 Flokbakterier og Type 0041/0675 (*Chloroflexi*)

Bedømt ud fra LDS lader det til, at BC-100 havde en stor effekt på flokbakterierne, idet mere end halvdelen af flokbakterierne nogle steder var døde under doseringsforløbet. Samtidig blev flokkene diffuse og svagere under doseringsforsøget.

Allerede i løbet af 1. doseringsperiode havde BC-100 en stor indvirkning på flokbakterierne. Dette kunne tyde på, at doseringen har været for kraftig. Flokkene blev under doseringsforløbet mere åbne, diffuse og 'slimede'. Det blev derfor undersøgt med genprober, om der var tale om kolonier af zoogloea eller lignende bakterier i slamflokkene. Desværre kunne FISH-analysen ikke bekræfte dette, idet de formodede slimdannende bakterier ikke var positive for de anvendte prober. Det kan således heller ikke forklares, hvad flokkenes 'slimede' udseende skyldes.

Lige efter midtvejsdoseringen var det tydeligt, at flere flokbakterier døde, og der var tilmed flere frie celler. Dette tyder på, at doseringen har virket forgiftende på flokbakterierne. Selve doseringen blev beregnet på baggrund af en slamkoncentration på 2,5 gSS/L. Da den høje startdosering og midtvejsdosering fandt sted blev slamkoncentrationen i anlægget målt til hhv. 5-6 og 3 g TS/L. Den beregnede doseringsmængde var derfor for lav i forhold til den aktuelle slamkoncentration i Øster Hornum Renseanlæg. Bedømt ud fra flokbakteriernes reaktion, tyder det dog på, at den anvendte dosering var tilstrækkelig og måske endda for høj. Den høje midtvejsdosering, som fandt sted da slamkoncentrationen var væsentligt lavere end ved den høje startdosering, resulterede formentligt i en overdosering, der forgiftede aktiv-slammet.

Effekten af BC-100 var dog størst på Type 0041/0675 (*Chloroflexi*), idet de tråde, der stak ud fra flokkene, allerede efter kun en uges dosering var helt eller delvis døde. Mange steder sås hele døde Type 0041/0675-tråde med levende påvækster, hvilket samtidig tyder på, at BC-100 specifikt havde en større effekt på *Chloroflexi* sammenlignet med de øvrige bakteriegrupper. Idet Type 0041/0675 klarede sig bedre i skummet, bekræfter dette også, at det netop var BC-100 og ikke andre faktorer, der påvirkede denne trådtype.

Størstedelen af de tråde, der stak ud fra slamflokkene og dermed havde betydning for TI, døde allerede i starten af doseringsforløbet. Men TI var dog længe uændret, hvilket kunne tyde på, at Type 0041/0675 (*Chloroflexi*) måske udgør en pulje af langsomt nedbrydelig biomasse i slammet.

5.7 Konklusion

Ud fra doseringsforsøget på Øster Hornum Renseanlæg kan det konkluderes, at BC-100 kan anvendes som kontrolkemikalie mod Mycolata. Dette begrundes med, at skumlaget forsvandt, og andelen af levende Mycolata i både aktiv-slammet og skummet blev reduceret som følge af doseringen med BC-100. Men bedømt ud fra karakteriseringen af aktiv-slammet og LDS virker BC-100 måske for kraftigt på flokkene i forhold til virkningen på Mycolata. Flokkene blev meget diffuse og fik et 'slimet' udseende under doseringsforsøget. Det var dog ikke muligt at klarlægge årsagen til dette. BC-100 havde størst effekt på Type 0041/0675 (*Chloroflexi*), idet disse tråde døde langt hurtigere og i

langt større omfang end de øvrige bakterier, som blev undersøgt. Dette tyder på, at BC-100 måske kan være velegnet som kontrolkemikalie mod Type 0041/0675 (*Chloroflexi*).

De skumdannende bakterier viste sig at tilhører gruppen Mycolata men det vides ikke hvilke arter, der er tale om. Det var heller ikke muligt at bestemme Mycolatas aktivitet, idet CTC umiddelbart ikke kunne trænge ind i cellerne. CTC kunne derfor ikke anvendes som en metode til at bestemme andelen af aktive Mycolata under doseringsforløbet

5.8 Perspektivering

I forbindelse med dette doseringsforsøg blev der i løbet de første to sammenhængende perioder doseret BC-100 i 7 uger, hvilket resulterede i, at skumlaget blev reduceret til under en meter. Men samtidig blev flokbakteriernes tilstand påvirket i en sådan grad, at det blev besluttet at holde en doseringspause. Hvorvidt skummet ville være forsvundet helt, hvis doseringen havde fortsat i 1-2 uger vides således ikke. Det vides heller ikke, om problemet herved ville være løst fuldstændig, eller om en ny skumdannelse alligevel havde fundet sted. Da disse blot er to af mange uafklarede spørgsmål vedrørende effekten af BC-100 på skumdannelse forårsaget af Mycolata, er det oplagt at lave lignende fuldskala doseringsforsøg med BC-100. I denne forbindelse kunne det samtidig være interessant nærmere at undersøge, om BC-100 også kan kontrollere bakteriearter tilhørende gruppen *Chloroflexi*.

Idet en del af flokbakterierne døde som følge af doseringen med BC-100 kunne det i fremtidige studier undersøges (evt. i andre anlæg), om de døde flokbakterier omfatter bestemte bakteriegrupper som f.eks. nitrifikanter, denitrifikanter eller fosforakkumulerende bakterier. I så fald må det klarlægges, i hvilket omfang dette kan påvirke den biologiske rensning af spildevandet. Udløbsværdierne for N, P og COD kan i dette tilfælde anvendes som den første indikator på, at der er problemer med den biologiske rensning. Efterfølgende kan genprober benyttes til at bestemme andelen af de forskellige bakteriegrupper, og disse tal kan derpå sammenlignes med værdier for lignende anlæg med tilsvarende konfiguration og drift. Til dette formål kan data fra Den Mikrobiologiske Database over Danske Renseanlæg med fordel anvendes. Hvis det viser sig, at BC-100 har en kontrollerende effekt på bakterierne generelt, må doseringsmængde og metode genovervejes, således at overdoseringer undgås, og behandlingen således optimeres.

6. Skumdannelse på Hvilsom Renseanlæg

Den første skumdannelse forårsaget af bakterier på Hvilsom Renseanlæg fandt sted i august måned, hvor temperaturen var relativt høj, men den fortsatte helt hen til oktober, hvor udtagningen af slamprøver blev påbegyndt. Formålet med at følge anlægget var at opstarte endnu et doseringsforsøg med BC-100, men idet skummet forsvandt fra anlægget relativt hurtigt og pludseligt, blev dette ikke aktuelt. De indsamlede data fra anlægget er dog medtaget her med henblik på at beskrive driften af anlægget og forsøge at klarlægge, hvorfor skummet på anlægget umiddelbart forsvandt af sig selv. På figur 23 ses skumdannelsen på Hvilsom Renseanlæg, da den var på sit højeste.

Fra anlægget blev der udtaget aktiv-slam- og evt. skumprøver 1-2 gange om ugen i den periode, hvor der var skum i anlægget, samt i de efterfølgende uger efter skummet var forsvundet. På prøveflaskerne blev der fra renseanlægget side noteret dato, SV (evt. SVI) og SS.

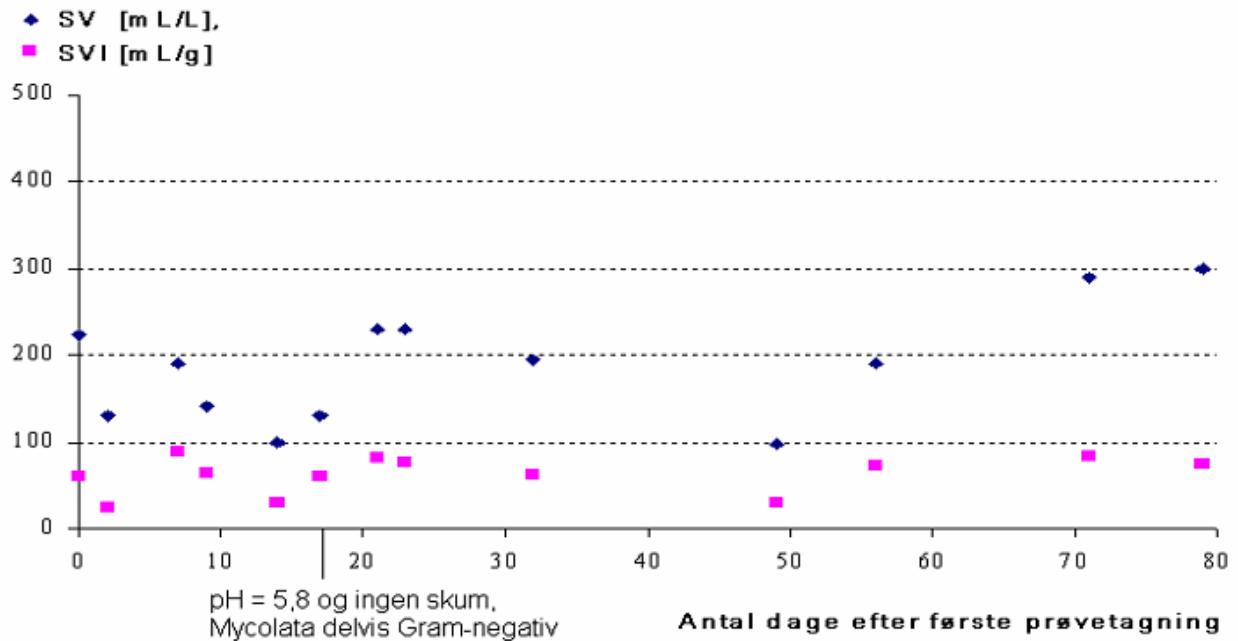


Figur 23: Skumdannelse forårsaget af Mycolata på Hvilsom Renseanlæg i oktober 2007.

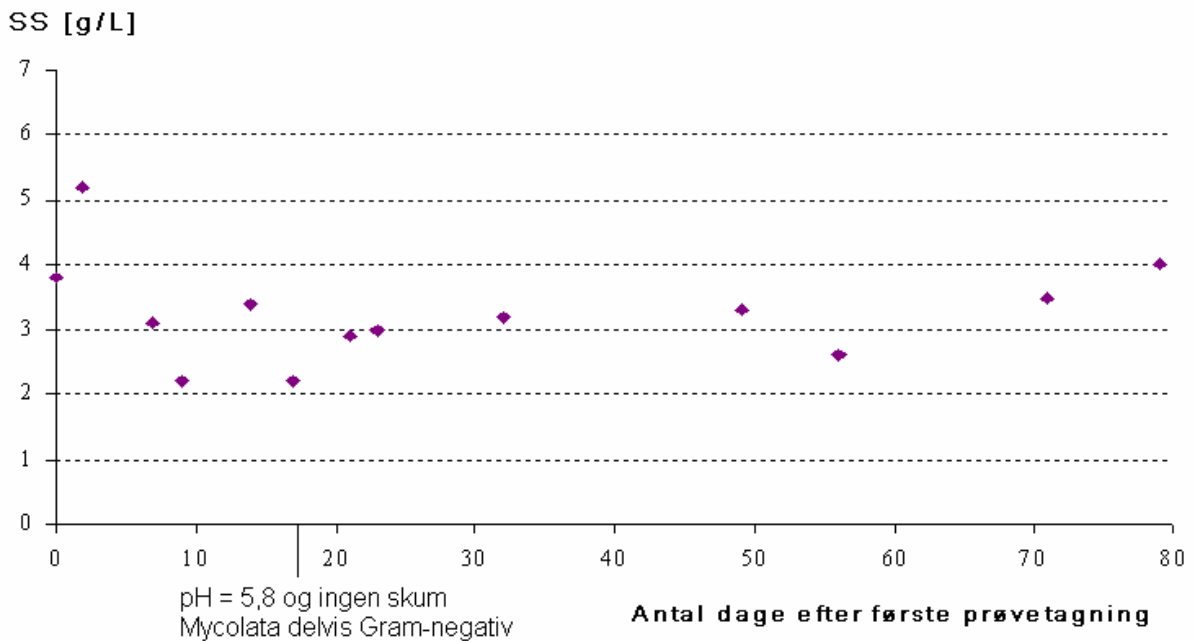
6.1 Ændring af bundfældningsegenskaber og skummets udbredelse

Den pludselige og meget kraftige reduktion af skum syntes umiddelbart svært at forklare. Men da pH i anlægget blev undersøgt, viste det sig, at pH under beluftning og i

sedimentaionsperioden lå på hhv. 5,8 og 5,45 da skummet forsvandt. Dette er meget lavt for et aktiv-slamanlæg, og det antages derfor, at den lave pH har haft en negativ effekt på forekomsten af de skumdannende bakterier.



Figur 24: Udviklingen af SV og SVI fra tidspunktet for første prøvetagning



Figur 25: Udviklingen af slamkoncentrationen (SS) fra tidspunktet for første prøvetagning.

Bedømt ud fra SV og SVI, havde aktiv-slammet på anlægget generelt tilfredsstillende bundfældningsegenskaber. Som det fremgår af figur 24, lå SVI konstant under 100 mL/g i hele prøveudtagningsperioden, mens slamkoncentrationen målt som SS varierede i løbet af prøvetagningsperioden mellem 2,2 g SS/L og 5,2 g SS/L (se figur 25).

6.2 Mikroskopering af aktiv-slam og skum

6.2.1 Identifikation og omfang af trådformede bakterier

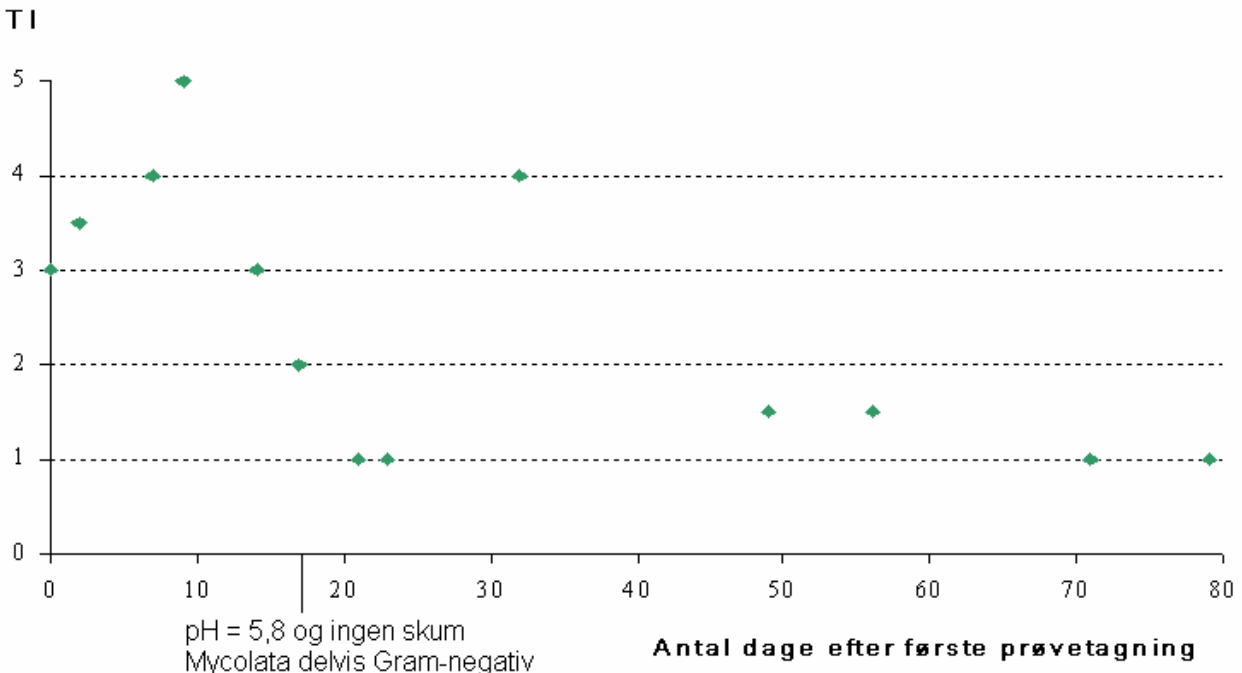
De dominerende tråde i slammet, som også gav anledning til skumdannelsen, blev ud fra morfologien identificeret som Mycolata, mens de sekundære tråde, som kun udgjorde omkring 10 %, vurderedes primært at tilhøre Type 0041/0675.

For at bekræfte identifikationen af de skumdannende trådformede bakterier, blev der anvendt genprober med forskellige specifikationer. FISH-analysen viste, at EUB-mix havde svært ved at trænge ind i de forgrenede filamenter. Denne probe gav således et usikkert positivt signal. Til gengæld var prøven tydeligt positiv for proben Myc-657, som rammer gruppen Mycolata. Filamenterne var endvidere negative over for den artsspecifikke probe GOR-596, der rammer *Gordonia*, men tydeligt positiv over for Spin-1449, som specifikt rammer *Skermania*. Det kan ud fra FISH-analysen derfor konkluderes, at skumdannelsen i Hvilsom Renseanlæg skyldes tråde tilhørende gruppen Mycolata og arten *Skermania*. Resultaterne af FISH-analysen fremgår af tabel 8.

Tabel 8: Resultater for identifikation af Mycolata

	Alle bakterier (EUB-mix)	Mycolata (Myc-657)	Skermania (Spin-1449)	Gordonia (GOR-596)
Identifikation af Mycolata	(+)	+	+	÷

Som en del af karakteriseringen af slammet blev TI vurderet under mikroskoperingen af slamprøverne. Udviklingen af TI i hele prøvetagningsforløbet fremgår af figur 26. I starten af forløbet steg TI fra 3 til 5, hvor det toppede. På dette tidspunkt var skumdannelsen på anlægget ligeledes på sit højeste. Men kun omkring 2 uger efter første prøveudtag skete der en væsentlig reduktion i skumdannelse såvel som TI. Dette førte til, at TI efter kun 3 ugers prøvetagning endte på 1, alt imens skummet fuldstændigt forsvandt kun 17 dage efter det første prøveudtag. I de efterfølgende uger, hvor der ikke så hyppigt blev udtaget prøver, steg TI igen til 4 for efterfølgende at falde til 1, men der blev ikke længere observeret skum i anlægget. I den periode, hvor der var skum på anlægget og TI > 2, var Mycolata tydeligvis dominerende, men med skummet forsvandt også Mycolata i slammet og vandfasen. Dette betød, at Mycolata i den efterfølgende periode kun var sekundær og udgjorde < 10 %. Den pludselige stigning i TI efter 32 dage skyldtes overraskende nok også Mycolata, men i de efterfølgende prøver var Mycolata igen reduceret til kun at udgøre den sekundære trådtype. Den pludselige opblomstring af Mycolata kan ikke umiddelbart forklares.



Figur 26: Udviklingen af TI fra tidspunktet for første prøvetagning.

I slammet stak mange Mycolata ud fra flokkene, men som nævnt befandt langt størstedelen sig i vandfasen mellem flokkene. Hvorvidt Mycolata dannede bro mellem flokkene, var derfor oftest svært at vurdere. Men sammenlignes SVI med TI, ses det, at et højt TI ikke umiddelbart gav anledning til dårlige bundfældningsegenskaber. Dette tyder på, at de små Mycolata-kolonier ikke havde en brodannende virkning. Mycolata påvirkede dog nogle steder flokstrukturen i kanten af flokkene, hvilket her medførte en diffus og åben flokstruktur, men generelt var de irregulære flokke kompakte og havde en fast flokform. Flokkestørrelsen var varierende, men det var tydeligt, at de mindre flokke var mere kompakte end de større. Efter Mycolatas forsvinden havde trådene stort set ingen indvirkning på flokkene, og kun enkelte steder skabte de lange tråde med påvækster lidt brodannelse mellem nogle flokke, men set i forhold til TI og SVI syntes dette ikke at have nogen negativ effekt på slammet.

6.2.2 Gram- og Neisserfarvninger

Da Mycolata var dominerende, var disse filamenter tydeligt Gram-positive, men da skummet forsvandt, var de få Mycolata, der var tilbage i slammet, oftest Gram negative. Denne ændring tyder på, at de tilbageværende Mycolata har taget skade, og at filamenternes cellevæg er blevet ødelagt. I de efterfølgende prøver viste Gramfarvningen ikke et entydigt resultat. Nogle Mycolata farvede således negativt, andre positivt, men størstedelen var en blanding mellem de to.

Ved Neisser farvningen farvede Mycolata negative, og afviger derfor fra Mycolata i Øster Hornum Renseanlæg. Dette bekræfter, at der er tale om forskellige arter i de to anlæg.

Langt størstedelen af Type 0041/0675 og lignende tråde var Gram-negative, men enkelte lidt tyndere tråde var Gram-positive. Generelt var disse tråde Neisser-negative. Trådene ændrede ikke karakter undervejs.

6.2.3 Dyr, frie celler og partikler

Under hele prøvetagningsforløbet kunne omfanget af organiske og uorganiske partikler betegnes som almindeligt, mens udbredelsen af frie celler, spirochaeter og dyr ændrede sig samtidig med Mycolatas forsvinden. Antallet af frie celler og spirochaeter ændrede sig således fra at være hhv. få og almindeligt til at være massivt. Antallet af dyr ændrede sig ligeledes, idet der til at starte med kun blev observeret få dyr i form af flagellater og enkelte klokke dyr samt kravlende ciliater. Lige efter skummets forsvinden var der tydeligvis flere klokke dyr og fritlevende ciliater, om end antallet stadig var lavt. Undervejs blev der desuden observeret et enkelt bjørnedyr og en stor orm, hvilket tyder på en relativt høj slamalder. I de efterfølgende prøver var omfanget af dyr igen aftaget, og der blev kun observeret flagellater og amøber i slammet.

6.3 Diskussion

6.3.1 Skum og bundfældningsegenskaber

Erfaringer fra andre renseanlæg har vist, at en lav slamkoncentration kan have en negativ indvirkning på Mycolata (Bøgh pers. kom., 2007). Dette har måske også var tilfældet i Hvilsom Renseanlæg, hvor SS lå omkring 2,2g SS/L på det tidspunkt, hvor skummet forsvandt. Den lave slamkoncentration kan således være en medvirkende årsag til skummets forsvinden, men den primære årsag formodes at være pH-faldet. De øvrige typer trådformede bakterier syntes mere hårdføre overfor den lave pH i anlægget, idet mængden af Type0041/0675 forblev uændret på trods af de skrappe betingelser.

Værdierne for SVI var generelt lave, men ved målingen af SV efter pH-faldet blev det observeret, at vandfasen var lidt uklar. Dette svæv skyldes sandsynligvis dels tilstedeværelsen af Mycolata i vandfasen og dels deflokkulering af slamflokkene grundet forgiftning. Svævet tyder på, at der kan være en høj slamkoncentration i det vand, som ligger over det bundfældede slam i anlægget. Dette er selvfølgelig ikke ønskeligt, idet anlægget herved risikerer slamflugt, når det rensede vand udledes via overløbet.

Tilsætning af BC-100, kunne være en løsning på problemet. Ud over at slå Mycolata ihjel, formodes det, at polymeren i BC-100 kunne samle de mange Mycolata, som befandt sig i vandfasen mellem flokkene. Densiteten ville herved kunne forøges, og Mycolata ville således blive trukket ned gennem vandet og sedimentere sammen med slamflokkene.

6.3.2 Lav pH

Ændringen af pH er en faktor, som har stor betydning for driften af et aktiv-slamanlæg. Det formodes, at pH-faldet ikke kun havde en indvirkning på Mycolata. Nyttige bakteriegrupper som nitrifikanterne er sandsynligvis også blevet påvirket af det sure miljø, hvilket kan have forringet rensningsgraden af spildevandet. Det kunne således være

interessant at undersøge dette, ved at sammenligne ind- og udløbsdata fra perioderne før, under og efter pH-faldet.

Årsagen til pH-faldet er ikke fundet, men en medvirkende årsag kunne være, at slammet i slamlagertanken har ligget for længe. Hvis dette har givet anledning til en længerevarende anaerob nedbrydning af slammet, kan der i tanken være skabt et surt miljø. Det drænvand, der ledes fra slamlagertanken og tilbage i procestanken, kunne således give anledning til et pH-fald i procestanken. Det virker dog usandsynligt, at dette skulle være den direkte årsag til den lave pH-værdi.

Den lave pH kan ligeledes skyldes lav alkalinitet i vandet, og da kvælstoffjernelsen i anlægget kun omfatter nitrifikation, kan dette bevirke, at alkaliniteten falder yderligere. Lav alkalinitet vurderes dog kun, at kunne være en medvirkende faktor til pH-faldet og således ikke den konkrete årsag.

En tredje mulighed er, at der er sket en forgiftning af slammet gennem det tilledte spildevand. Da der her er tale om et lille anlæg, er det sandsynlig, at en forholdsvis lille men meget sur forurening af det tilledte spildevand har haft stor indvirkning på pH i anlægget. Dette lader umiddelbart til at være den mest sandsynlige årsag til pH-faldet.

Den lave pH kan som nævnt være ødelæggende for hele den biologiske rensning i anlægget, og derfor er anlægget siden pH-faldet blevet tilført kalk for at hæve pH og dermed skabe bedre betingelser for mikrobiologien i anlægget.

6.4 Konklusion

I dette casestudie, som vedrørte Hvilsom Renseanlæg, var det desværre ikke muligt at undersøge effekten af BC-100 på skumdannende Mycolata. Dog blev der gjort andre iagttagelser, hvoraf det bl.a. kan konkluderes, at udbredelsen af skum og omfanget af Mycolata forsvandt ved lav pH. Samtidig med pH-faldet ændredes Mycolatas cellevæggen, hvilket også bekræfter den negative indvirkning, som det sure miljø havde på disse skumdannende bakterier. Den lave pH-værdi formodes derfor at have en kontrollerende virkning på skummet i anlægget, men det anbefales ikke at anvende pH-styring som kontrolstrategi.

Vurderet ud fra SVI havde tilstedeværelsen af Mycolata i vandfasen mellem flokken umiddelbart ingen indflydelse på slammets bundfældningsegenskaber, men de Mycolata, der befandt sig i vandfasen mellem flokkene, mistænkes for ikke at bundfælde sammen med slamflokkene.

De skumdannende bakterier tilhørte gruppen Mycolata og herunder arten *Skermania*. Dette blev først vurderet ud fra morfologien og dernæst verificeret vha. geneprober.

6.5 Perspektivering

Selvom det ikke var muligt at undersøge effekten af BC-100 på Mycolata i Hvilsom Renseanlæg, har dette casestudie alligevel givet en bedre indsigt i, hvordan pludselige pH-fald kan have en særdeles kontrollerende effekt på Mycolata. Idet der ikke blev lavet LDS på slam- og skumprøverne fra Hvilsom Renseanlæg er det dog svært at vurdere, hvor stor en andel af Type 0041/0675, der var levende efter pH-faldet. Det kunne således være interessant at lave tilsvarende studier, hvor pH-værdiens indflydelse på trådenes tilstand blev undersøgt i laboratorieforsøg ved at udsætte slamprøverne for forskellige pH-værdier eller pH-forløb og dernæst undersøge andelen af levende bakterier med metoder som LDS. Herved vil det måske kunne undersøges, om de tilbageværende tråde er levende, eller om de er døde og blot svært nedbrydelige, som det syntes at være tilfældet i Øster Hornum Renseanlæg.

7. Forslag til driftsoptimering med henblik på kontrol af Mycolata

Denne gennemgang af renseanlæggene har til formål at undersøge, hvordan anlæggene er designet i forhold til den aktuelle belastning og samtidig vurdere om driften af anlæggene kunne optimeres med henblik på at afhjælpe problemer med skumdannelse forårsaget af Mycolata.

7.1 Analyse af anlægsdesign og drift

7.1.1 Dimensionerings- og beregningsgrundlag

Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg er dimensioneret til en belastning på hhv. 1100 PE og 600 PE, men som det fremgår af tabel 1 og 2 i kapitel 3, er den aktuelle belastning på Øster Hornum Renseanlæg væsentlig mindre, hvilket også formodes at være tilfældet for Hvilsom Renseanlæg. Desværre har det i forbindelse med dette projekt ikke været muligt at skaffe det oprindelige dimensioneringsgrundlag for de to renseanlæg. Ydermere er der en række parametre vedrørende den nuværende belastning og drift af anlæggene, som heller ikke har været tilgængelige. Dette bevirker, at beregningsgrundlaget for analysen bygger på en række antagelser, som forventes at være realistiske, men som samtidig bidrager til analysens usikkerhed.

Både Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg er design- og procesmæssigt forholdsvis simple anlæg. Renseprocesserne på begge anlæg omfatter på nuværende tidspunkt kun nitrifikation, og på Øster Hornum Renseanlæg anvendes der desuden kemisk fosforfjernelse. Dimensioneringen og driften af anlæggene vurderes derfor ud fra, om nitrifikationsprocessen kan forløbe optimalt. Hvorvidt anlæggene er dimensionerede korrekt i forhold til de aktuelle forhold, bedømmes således ud fra den aerobe slamalder i anlæggene. Beregningsgrundlaget for analysen af de to anlæg fremgår af tabel 9 og 10, mens den anvendte beregningsmetode findes i bilag 6.

Tabel 9: Beregningsgrundlag for analyse af Øster Hornum Renseanlæg:

Parameter	Værdi	Datagrundlag
Arbejdsvolumen, V_{drift}	475 m ³	Oplyst af anlægget
Slamkonc., $X_{\text{aktiv-slam}}$		
- vinter	5 kgSS/m ³	Antagelse (Vollertsen pers. kom., 2008)
- sommer	3 kgSS/m ³	Antagelse (Vollertsen pers. kom., 2008)
Flow, Q_{ind}	400 m ³ /døgn	Antagelse (Andersen pers. kom., 2007)
BOD-belastning, $m_{\text{BOD,ind}}$	46 kgBOD/døgn	Middelværdi for 2007, oplyst af anlægget
Udbyttekonstant, Y_{obs}	0,8 kgSS/kgBOD	Antagelse (Vollertsen pers. kom., 2008)

Tabel 10: Beregningsgrundlag for analyse af Hvilsom Renseanlæg:

Parameter	Værdi	Datagrundlag
Arbejdsvolumen, V_{drift}	301 m ³	Oplyst af anlægget
Slamkonc., $X_{aktiv-slam}$		
- vinter	5 kgSS/m ³	Antagelse (Vollertsen pers. kom., 2008)
- sommer	3 kgSS/m ³	Antagelse (Vollertsen pers. kom., 2008)
Flow, Q_{ind}	120 m ³ /døgn	Beregnet: 600 PE à 0,2 m ³ PE _{vand} /døgn
BOD-belastning, $m_{BOD,ind}$	36 kgBOD/døgn	Beregnet: 600 PE à 0,06 m ³ PE _{BOD} /døgn
Udbyttekonstant, Y_{obs}	0,8 kgSS/kgBOD	Antagelse (Vollertsen pers. kom., 2008)

7.1.2 Dimensionering i forhold til aktuel belastning

Ved en temperatur på 5 °C er den nødvendige aerobe slamalder på omkring 20 dage (bilag 6). Da temperaturen i begge anlæg selv ikke i vintermånederne formodes at være lavere end dette, antages det, at en aerob slamalder på 20 dage er rigeligt til at opnå en tilfredsstillende nitrifikation året rundt. Om sommeren, hvor temperaturen er højere, er den nødvendige aerobe slamalder kun omkring 10 dage.

I begge renseanlæg viste beregningerne (bilag 6), at den aerobe slamalder både om vinteren og om sommeren er mere end dobbelt så lang i forhold til, hvad der er nødvendig for at opnå en tilstrækkelig nitrifikation. Den lange aerobe slamalder vidner således om, at anlæggene er overdimensionerede i forhold til den nuværende belastning. De beregnede værdier fremgår af tabel 11

Tabel 11: Resultatoversigt for begge anlæg

Parameter	Øster Hornum Renseanlæg	Hvilsom Renseanlæg
Slammasse, m_{slam}		
- vinter	2375 kgSS	1505 kgSS
- sommer	1425 kgSS	903 kgSS
Slamproduktion, F_{SP}	36,8 kgSS/døgn	28,8 kgSS/døgn
Aerob slamalder, θ_{aerob}		
- vinter	65 dage	52 dage
- sommer	39 dage	31 dage

7.2 Forslag til kontrolmetoder til bekæmpelse af Mycolata

Som beskrevet i afsnit 1.3 *Kontrolmetoder til bekæmpelse af trådformede bakterier* findes der flere forskellige metoder til populationskontrol af trådformede bakterier i aktiv-slam anlæg. Generelt kan disse kontrolstrategier inddeles i tre typer: kemisk kontrol, fysisk kontrol og processtyring. I det følgende beskrives og vurderes disse tre kontroltyper i forhold til bekæmpelse af skumdannende Mycolata på Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg.

7.2.1 Kemisk kontrol

Dosering af kemiske produkter som kontrolmetode har generelt til hensigt, at dræbe bakterierne enten direkte eller indirekte.

Dosering af klor dræber bakterierne mere direkte, og kan derfor anvendes som akut løsning, hvis der pludselig opstår en massiv opblomstring af Mycolata. Men det frarådes at gøre dette, hvis der findes andre alternativer. Doseringen med klor er generel vanskelig at optimere, og idet begge renseanlæg er relativt små, vil blot en lille overdosering kunne få alvorlige konsekvenser for det aktive slam.

Doseringen af BC-100 kan derimod anvendes som en vedvarende kontrolmetode for Mycolata. Selvom doseringsforsøget på Øster Hornum viste, at BC-100 ligeledes påvirkede flokbakterierne, forventes det, at doseringen med dette produkt kan optimeres således, at det får den ønskede effekt. Som beskrevet tidligere kunne dosering af BC-100 gennem et sprinklersystem være løsningen. Herved kunne BC-100 doseres direkte til skummet, og dermed virke mere direkte og effektivt på problemet.

7.2.2 Fysisk kontrol

Skumdannende Mycolata kan kontrolleres fysisk ved manuelt at fjerne skumlaget på procestanken eller spule skumlaget med vand. Ved at fjerne skummet fjernes også en stor del af grundlaget for yderligere skumdannelse, men dette løser sandsynligvis kun problemet, hvis det gøres kontinuerligt. For selvom langt størstedelen af Mycolata befinder sig i skummet, vil der stadig være en stor pulje i aktiv-slammet, som kan give anledning til ny skumdannelse. Ved at spule skummet med vand, tvinges de skumdannende bakterier ned i vand- og slamfasen. Her er levebetingelserne for Mycolata mindre favorable, bl.a. fordi de må konkurrere med de øvrige bakterier om substrat. Ved at tvinge Mycolata ned i vandfasen er der samtidig større mulighed for, at de bundfælder sammen med slamflokkene. Men sandsynligvis vil Mycolatas hydrofobe overflade tvinge disse bakterier til at søge op mod overfladen igen, så snart det er muligt.

Ved at fjerne skummet og/eller spule det ned i vand- og slamfasen symptombehandles problemet kun. Det er således ikke at forvente, at disse kontrolmetoder vil kontrollere Mycolata på længere sigt.

7.2.3 Processtyring

Princippet bag kontrol af trådformede bakterier gennem styring af procesbetingelserne er at styre tilgængeligheden af elektronacceptorer og elektrondonorer for biomassen i

anlægget. Dette er ligeledes princippet bag selektorer. Når bakterierne omsætter substrat under aerobe, anoxiske eller anaerobe forhold benytter de forskellige elektronacceptorer. Denitrifikanterne benytter eksempelvis nitrat som elektronacceptor under anoxiske forhold og omdanner herved nitrat til frit kvælstof. Mycolata foretrækker aerobe forhold men kan ligeledes omsætte substrat under anoxiske forhold (Eales et al., 2006). Det har dog vist sig, at anlæg med denitrifikation – og dermed skiftende aerobe og anoxiske forhold – kun sjældent har problemer med skumdannende Mycolata (Nielsen pers. kom., 2008).

Idet den aerobe slamalder i både Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg er mere end dobbelt så lang som nødvendigt, er det muligt at reducere beluftningstiden med 50 %, uden at dette burde få indflydelse på omsætningen af ammonium. For begge anlæg vil det derfor være muligt at omlægge driften, således at spildevandet beluftes 50 % af tiden (aerob) og omrøres 50 % af tiden (anoxisk) (Vollertsen pers. kom., 2008). En sådan driftsomlægning ville skabe ufavorable vækstbetingelser for Mycolata, idet disse bakterier som nævnt bedst omsætter substrat under aerobe forhold. Konkurrencen om substrat vil således være skærpet, og dette vil forhåbentligt bevirke, at Mycolata udkonkurreres af andre bakterier i aktiv-slammet. Hertil kommer dog, at *Microthrix*, som ofte også giver anledning til driftsproblemer i form af skumdannelse, trives særdeles godt under de skiftende aerobe og anoxiske forhold. Driftsomlægningen, som har til hensigt at løse et problem, kunne således samtidig give anledning til et andet.

Der er dog andre fordele ved denne form for driftsomlægning, hvoraf implementeringen af denitrifikation i anlægget er et af de centrale. Erfaringen viser, at nitrifikation og denitrifikation tidsmæssigt kræver nogenlunde samme slamalder for at kunne forløbe (Vollertsen pers. kom., 2008). Den lange slamalder bevirker således, at der er rigelig med tid til, at begge processer kan nå at finde sted, og dermed forurenes recipienten ikke med uhensigtsmæssige mellemprodukter som ammonium og nitrit. Samtidig antages det, at bionedbrydeligheden og mængden af det organiske materiale i begge anlæg er velegnet til denitrifikation. Denne antagelse bygger på, at der er tale om små lokale anlæg, hvor transporttiden i afløbssystemet er så kort, at kun en lille del af det letomsættelige organiske materiale bliver omsat, inden det når renseanlægget (Vollertsen pers. kom., 2008). Der burde således både være et højt BOD/COD-forhold og C/N-forhold i det tilledte spildevand og dermed tilstrækkeligt med letomsætteligt substrat til de denitrificerende bakterier.

7.3 Forslag til driftsoptimering

I de foregående afsnit er der givet flere forslag til, hvordan problemet med skumdannende Mycolata kan gribes an. Set i forhold til den måde anlæggene drives nu, vurderes det, at en omlægning af driften til også at omfatte denitrifikation er den bedste løsning. Dette bør dog eventuelt til at starte med kombineres med dosering af BC-100 og/eller fysisk kontrol, indtil processerne i anlægget fungerer optimalt.

Overdimensioneringen af procestanken på begge renseanlæg giver samtidig mulighed for at omlægge driften af anlægget med minimale omlægningsomkostninger. Dette skyldes, at en af de største driftsomkostninger ved et aktiv-slam-anlæg, er at skabe aerobe forhold gennem beluftning. Ved at reducere den aerobe slamalder og dermed beluftningstiden

kan der ud over en forbedret rensning af spildevandet tilmed opnås en væsentlig besparelse i driftsomkostninger. Installeringen af omrører i anlægget er selvfølgelig en driftsomlægningsudgift, som må påregnes. Men den strømbesparelse der opnås ved at omrøre spildevandet i stedet for at belufte, vil på sigt antageligt kunne betale de omkostninger, der er forbundet med driftsomlægningen. Hvis driften af anlæggene omlægges således, at der beluftes 50 % af tiden og omrøres 50 % af tiden, vil der kunne opnås en besparelse på op mod 30 % i driftsomkostninger (Vollertsen pers. kom., 2008).

I forbindelse med driftsomlægningen er det rent praktisk en fordel at oprense ringkanalen. Erfaringer viser nemlig, at der ofte er store sandaflejringer i procestanken, som bevirker, at den aktuelle kapacitet af anlægget er væsentligt mindre end den beregnede. Dette skyldes, at nogle sandfang ikke er effektive nok til at tilbageholde sand osv., og dermed ender det i selve procestanken (Vollertsen pers. kom., 2008).

7.4 Perspektivering i forhold til driftsoptimering

Ved hjælp af Den Mikrobiologiske Database over Danske Renseanlæg kunne det være interessant at undersøge, hvorvidt der findes sammenhænge mellem anlægstyper/ rensemetoder, anlægskonfiguration og driftsproblemer forårsaget af bestemte typer trådformede bakterier som eksempelvis Mycolata. Sådant viden kunne med fordel anvendes til at forbygge og løse problemer, der relaterer sig til trådformede bakterier.

8. Referencer

- Andersen, V. (2007), personlig kommunikation. Anlægspasser ved bl.a. Øster Hornum Renseanlæg, Rebild kommune
- Bøgh, A. M. (2007), personlig kommunikation. Produktchef ved Kemira Water Danmark A/S
- Eales, K. L., Nielsen, J. L., Seviour, E. M., Nielsen, P. H. & Seviour, R. J. (2006). *The in situ physiology of Skermania piniformis in foams in Australian activated sludge plants*. Environmental Microbiology 8: 1712-1720.
- Eikelboom, D. H. (2002). *Process Control of Activated Sludge Plants by Microbial Investigation*. IWA Publishing, UK
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J.I.C. og Arvin, E., (2006). *Teoretisk spildevandsrensning – Biologiske og kemiske processer*. 3. udgave, 1. oplag. Polyteknisk Forlag
- Iversen, N. (2005). *Værkstedskursus B 2005*, 2. udgave. Institut for Bio- og Miljøteknologi, AAU.
- Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. T. (1993). *Manual of the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*, Lewis Publishers.
- Jin et al. (2005). *The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in Candida albicans biofilms*. Mycopathologia. 2005 Apr;159(3):353-60.
- Kemira Water (2006). *Bulk Control 100 – product for control of filamentous bacteria*, Product information, Kemira. (bilag 1 i denne rapport)
- Kragelund, C. (2006). *In situ physiology of filamentous bacteria in industrial activated sludge treatment plants*. Ph.D. Dissertation (2006). Section of Environmental Engineering, Aalborg University.
- Kragelund, C., Nisson, B., Eskilsson, K., Fritzon, K., Bøgh, A. M. & Nielsen, P. H. (2007 B). *Control of filamentous foam formers by chemical addition*. Konferencen: 14th Gothenburg Symposium 2007, nr. 14, Ljubliana, Slovenien, 20. maj 2007 - 23. maj 2007.
- Kragelund, C., Remesova, Z., Nielsen, J. L., Thomsen, T. R., Eales, K., Seviour, R., Wanner, J. & Nielsen, P. H. (2007 A). *Ecophysiology of mycolic acid-containing Actinobacteria (Mycolata) in activated sludge foams*. FEMS Microbiol Ecol 61: 174-184.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schliefer, K & Wagner, M. (1999). *Combination of Fluorescent in situ Hybridisation and Microradiography – a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology*. Applied and Environmental Microbiology.
- Madigan, M. T. & Matinko, J. M. (2006). *Biology of microorganism*, 11. udgave. Pearson Education Inc.
- Mielczarek, A., Stevenson, M., Lison, M. & Nielsen, P. H. (2008). *Den Mikrobiologiske Database over Danske Renseanlæg*. Aalborg Universitet, Institut for Kemi, Miljø og Bioteknologi.
- Muhovic, N. (2007) personlig kommunikation. Laborant ved Hobro Renseanlæg, Mariager Fjord kommune
- Nielsen, P. H., Kragelund, C., Nielsen, J. L., Tiro, S., Lebek, M., Rosenwinkel, K.-H., Gessesse, A. (2005). *Control of Microthrix parvicella in activated sludge plants by dosage of polyaluminium salts : Possible mechanisms*. Wiley-VCH, Weinheim, ALLEMAGNE (1973- 2006) (Revue), 2005, vol. 33: 255-261

- Nielsen, P. H. (1997). *Neisser Stain*. Metodeark til Neisserfarvning, Institut for Bio- og Miljøteknologi, AAU
- Nielsen, P. H., Nielsen, J. L., og Andreasen, K. (1999). *Trådformede bakterier – et problem i renseanlæg*. *Naturens Verden* 7: 33-40.
- Nielsen, P. H., Eriksen, P. S., Kragelund, C., og Stevenson, M. (2007). *Den mikrobielle database – bundfældningsegenskaber og trådformede bakterier*. *Spildevandsteknik* 1: 40-42
- Nielsen, P. H. (2007) personlig kommunikation. Professor ved Aalborg Universitet.
- Nielsen, P. H. (2007). Præsentationsslides vedrørende Den Mikrobiologiske Database, Temadag på AAU d. 24. april 2007, Institut for Bio- og Miljøteknologi, AAU
- Nilsson, B. (2007), personlig kommunikation og beregning af doseringsforløb med BC-100. Principal Scientist at R&D Inorganic Coagulants ved Kemira Water Sverige
- Nilsson, B. & Eskilsson, K. (2007). *Bulk Kontrol 100 (BC-100) – Introduction to- and application of BC-100*. Kemira Kemira Water, Kemira Water Technology.
- Pedersen, L., & Sørensen, J., (Udateret). *En metode til afhjælpning af trådformede bakterier*. Spildevandslaboratoriet, Århus kommune.
- Polysciences Inc. (1999). (Udleveret manual til CTC)
- Seka, M.A., Hammes, F., & Verstraete, W. (2003). *Predicting the effects of chlorine on the micro-organisms of filamentous bulking activated sludges*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 562-568.
- Soddell, J.A. and Seviour, R.J. (1990) *Microbiology of foaming in activated sludge plants*. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 145-176.
- Stevenson, M. (2008), personlig kommunikation. Laborant ved AAU
- Vollertsen, J., Jahn, A., Nielsen, J.L., Hvitved-Jacobsen, T., & Nielsen, P.H. (2001). *Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater*. *Water Research* 35: 1649-1658.
- Vollertsen, J. (2007) personlig kommunikation. Associate Professor ved Aalborg Universitet.
- Winther, L., Henze, M., Linde, J.J. og Jensen, H.T. (2004). *Spildevandsteknik*. 3. udgave, 1. oplag. Polyteknisk Forlag

BILAG 1: Datablad og Leverandørbrugsanvisning for BC-100

Kemwater™ BC-100

Bulking Control 100 - et produkt til kontrol af trådformige bakterier

BC-100 er en unik blanding af uorganiske salte og organiske polymerer. Produktet anvendes i biologiske renseanlæg for at fremme en god biologisk funktion samt for at reducere og forhindre forekomsten af uønskede trådformige bakterier.

For at fremme en enkel håndtering og gode blandingsegenskaber tilbydes BC-100 i væskeform.

Dosering:
Dosering og behandlingstid bestemmes af anlæggets størrelse og tilstanden i den biologiske proces og skal afgøres i samarbejde med Kemira Water Danmarks personale.

Materiale af messing skal undgås.

Leveringsform:
BC-100 leveres i IBC-container eller tankbil.

pH	5-7
Krystallisationstemperatur	<-10 °C
Densitet ved 20 °C	1 140 kg/m ³
Farve	Gullig væske
Leveringsform	Bulk, 800 / 1000 l palletanke, 200 l tromler, 25 l dunke
Producent	Kemira Kemi AB, Kemwater

Denne tekniske information er kun vejledende

Kemira Water Danmark A/S 2008-01-18

KEMIRA WATER DANMARK indgår i Kemirakoncernen

KEMIRA WATER DANMARK A/S
G-Vej 3
2300 København S
Danmark

Telefon 33 13 67 11
Telefax 33 13 85 42
www.kemira.dk

LEVERANDØRBRUGSANVISNING

1. Produkt		BC-100		
Handelsnavn:	Kemwater BC-100			
Anvendelsesområde:	Bulking Control 100 - et produkt til kontrol af trådformige bakterier			
Leverandør:	Kemira Water Danmark A/S G-Vej 3, 2300 København S Kontaktperson: Annette Ejsing Telefon: 33 13 67 11	Producent:	Kemira Kemi AB P.O. Box 902 251 09 Helsingborg, Sverige Telefon: +4642171000	
<i>Telefon nødsituation:</i>	82 12 12 12	PR nr:		
2. Sammensætning				
Kemisk navn:				
Stofnavn:	EINECS nr.:	CAS nr.:	Indhold % :	Klassificering:
Calcium chloride		10043-52-4 233-140-8	10 - 19 %	Irriterende Xi, R36
Epiklorhydrin- dimetylamin- kopolymer		42751-79-1	2 - 10 %	R52/53
3. Fareidentifikation				
Mærkning:				
Akutvirkning:				
Kronisk virkning:				
Miljøvirkning:	Ikke klassificeret som værende farlig for helbred eller miljø			
4. Førstehjælp				
Generelt:	Vis denne leverandørbrugsanvisning til læge			
Hud:	Grundig afvaskning med vand og sæbe			
Øjne:	Skyl med vand			
Indtagelse:	Kontakt læge ved større mængde indtagelse			
Indånding:	Ingen risiko som kræver første hjælp.			
5. Brandslukning				
Brandfare:	Produktet er ikke brandbart			
Slukningsmidler:	Alle			
- Brug ikke:	-			
Særlige farer:	Ingen specielle risici			
Beskyttelse af brandmandskab:	Ingen særlige krav			
6. Spild / uheld				
Personbeskyttelse:	For personlig beskyttelse se under afsnit 8			
Miljøbeskyttelse:	Minimer udbredningen gennem inddæmning med inert absorptionsmiddel (sand, grus)			
Opsamling:	Små mængder kan spules til afløbet med rigelig mængde vand. Store mængder: informer redningstjeneste ved udstip til vandløb, mark eller afløb			

LEVERANDØRBRUGSANVISNING

7. Håndtering / lagring		BC-100	
Håndtering:	For personlig beskyttelse se under afsnit 8		
Opbevaring:	Opbevares i original-beholdere. Materialer som skal undgås: ingen specielle farer		
8. Påvirkning / personlige værnemidler			
Påvirkningsmuligheder:			
Personbeskyttelse:	Arbejdsplads og arbejdsmetoder udformes så direkte kontakt med produktet undgås		
- Indånding:	-		
- Hænder:	Gummi- eller plasthandsker Gennembrudstid PVC: > 6 timer Neophren > 6 timer		
- Øjne:	Beskyttelsesbriller eller ansigtsskærm		
- Hud:	Ingen særlige krav		
<i>Nødbruiser og øjenskylleflaske bør forefindes på arbejdsstedet.</i>			
9. Fysisk-kemisk egenskaber			
Udseende, lugt:	Gul med ubetydelig lugt	Viskositet:	-
Massefylde:	ca 1,2 gr/cm ³	Opløselighed i vand:	Ubegrænset
Flammepunkt:	Ikke brandbart	pH værdi:	5-7
Kogepunkt:	ca 100 °C	Frysepunkt:	< -10 °C
10. Stabilitet og reaktivitet			
Forhold, der skal undgås:	Stabil ved normale forhold		
Materialer, der skal undgås:	Ingen specielle risici		
Stabilitet:			
11. Toksikologiske oplysninger			
Oral LD50, rotte (mg/kg):	Calcium klorid: 1.000 mg/kg Epiklorhydrin-dimetylamin-kopolymer: 5.000 mg/kg		
Hygiejnisk grænseværdi:			
Generelt:			
Indånding:			
Hudkontakt:			
Kontakt med øjnene:			
Indtagelse:			
12. Miljøoplysninger			
Nedbrydelighed:			
Bioakkumulering:			
Økotoxicitet:			
Yderligere information:			
13. Bortskaffelse			

LEVERANDØRBRUGSANVISNING

14. Transportoplysninger BC-100

Ikke klassificeret som farligt gods i henhold til ADR

UN nr.:

IMDG:

PG:

EMS:

RID / ADR klasse:

FARESEDDEL:

15. Mærkning

Klassificering efter EU:

Optaget på miljøstyrelsens liste:

R-sætninger: Ingen

S-sætninger: Ingen

EINECS Nr.:

CAS Nr.:

16. Andre oplysninger

Særlig uddannelse:

Ingen, men der skal instrueres grundigt i brug af produktet før arbejdet

Anvendelsesbegrænsning:

Ingen under 18 år må arbejde med produktet i.flg Arbejdsministeriets bekendtgørelse nr. 239 af 6/4-05, bilag 2 A

Referencer:

Bekendtgørelse nr. 329 af 16. maj 2002 om klassificering, emballering, mærkning, salg og opbevaring af kemiske stoffer og produkter
 Bekendtgørelse nr. 923 af 28/09/2005 om listen over farlige stoffer
 Bekendtgørelse nr. 21 af 16. januar 1996 af lov om kemiske stoffer og produkter
 Bekendtgørelse nr. 559 af 04/07/2002 om særlige pligter for fremstillere, leverandører og importører mv. af stoffer og materialer efter lov om arbejdsmiljø
 Bekendtgørelse nr. 619 af 27/06/2000 om affald
 Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 292 af 26 april 2001 om arbejde med stoffer og materialer (kemiske agenser)
 Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 301 af 13. maj 1993 om fastsættelse af kodenumre
 Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 239 af 6. april 2005 om unges arbejde
 AT-Vejledning C.0.1 April 2005: Grænseværdier for stoffer og materialer
 Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 1049 af 27. oktober om begrænsning af VOC i produkter til overfladebehandling og billakering
 EU forordningen 1907/2006 (REACH)

Liste over alle relevante risikosætninger:

R 36

Irriterer øjnene

R 52/53

Skadeligt for vand-levende organismer, kan forårsage skadelige langtidseffekter i vandmiljøet

Udskrevet: 30-01-2008

BILAG 2: Mikroskopering af aktiv-slam- og skumprøver

Renseanlæg: _____

Slamprøve fra:

Udtaget, dato:

Mikroskopert, dato:

1. Trådformede bakterier

Trådindeks:

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

Trådtyper:

	%-andel		%-andel
Beggiatoa		Type 0041/0675	
H. Hydrosis		Type 0092	
M. parvicella		Type 021N	
N. limicola		Type 0803	
Nocardia		Type 0914	
Thiothrix		Type 1851	
Anden:		Anden:	

2. Flokstruktur

Trådenes påvirkning af flokstruktur:

Ingen/ringe påvirkning	Bro mellem flokke	Skaber åben struktur

Flokstørrelse:

<0,15 mm	0,15-0,5 mm	>0,5 mm

Flokform:

Fast eller	<input type="text"/>	Rund eller	<input type="text"/>	Diffus eller	<input type="text"/>
Svag	<input type="text"/>	Irregulær	<input type="text"/>	Kompakt	<input type="text"/>

3. Dyr

Antal pr. dækglas	1-5	5-20	20-100	>100
Amøber (tilføj typer)				
Flagellater				
Fritsvømmende ciliater				
Fastsiddende ciliater				
Kravlende ciliater				
Fritlevende ciliater				
Andet				

4. Diverse

Antal pr. dækglas	Ingen	Få	Alm.	Massiv
Organiske partikler/fibre				
Uorganiske partikler				
Frie celler				
Spirochaeter				
Zoogloea				

5. Farvninger

Gram: _____

Neisser: _____

BILAG 3: Forsøgsmanual til FISH-analyse

Formål

Identifikation af de skumdannende Mycolata og Type 0041/0675

Kemikalier

- 96 % ethanol
- Demineraliseret vand
- 0,1 M HCl

Lysozym-opløsning (laves i 2 mL Eppendorfrør)

- 20 mg lysozym
- 200 µL 0,5 M EDTA
- 200 µL 1,0 M Tris-HCl-opløsning, pH 7,5
- 600 µL MilliQ-vand

Achomopeptidase (AP) (laves i 2 mL Eppendorfrør)

- 8 µL AP-stamopløsning
- 2000 µL AP-buffer (0,01 M NaCl og 0,01 M Tris-HCl)

Hybridiserings- og vaskebuffer

- FA
- MilliQ vand, autoklaveret
- 5 M NaCl
- 1 M tris-HCl
- 10 % SDS
- EDTA

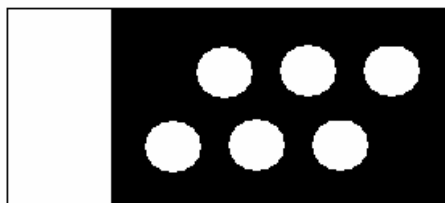
Prober:

Specifikation	Probenavn	% FA
Bakterier, generel probe	EUBmix	Underordnet
Mycolata, gruppespecifik probe	Myc-657	30 % FA
<i>Skermania</i> , arts-specifik probe	Spin-1449	35 % FA
<i>Gordonia</i> , arts-specifik probe	Gor-596	30 % FA
<i>Chloroflexi</i> , gruppespecifik probe	Cfx_mix	35 % FA
<i>Aquaspirillum</i> , gruppespecifik probe	Floc-997	35 % FA
Phylum candidiate division TM7	TM7-905	20 % FA

Materialer og Apparaturer

- Hønsrerør + propper
- 2 mL Eppendorfrør
- Amann-objektglas
- Pincet
- 50 mL centrifugerør
- Serviet
- Varmeskab (46 °C og 37 °C)
- Vandbad (48 °C)

Armann-objektglas:



Fremgangsmåde

A) Fixering

Da Mycolata er Gram positiv fixeres prøven i et hønserør med 96 % ethanol i forholdet 1:1 og opbevares i fryseren ved -20 °C indtil videre brug.

B) Immobilisering på Amann-objektglas

1. 15 µL af den fixerede prøve overføres til hver af brøndene på et Amann-objektglas (se tegning).
2. Prøverne tørres 15-30 min i varmeskab ved 46 °C, for at sikrer en god binding af prøven til glasset. Prøven skal være fuldstændig tør inden næste trin.

C) Permeabilisering

Da Mycolata her en cellevæg, der kan være svært gennemtrængelig for genproberne, må der forud for hybridiseringen foretages en permeabiliserings-procedure, når der anvendes prober, som har til hensigt at ramme Mycolata eller undergrupper af Mycolata.

1. Lysozymbehandling
 - 15 µL lysozym-opløsning overføres til hver af brøndene.
 - Amann-objektglasset lægges vandret i et 50 mL centrifugerør. I røret lægges forinden et stykke serviet fugtet med demineraliseret vand. Dette gøres for at undgå, at enzym-opløsningen skal fordampe og dermed øge enzymkoncentrationen.
 - Centrifugerøret placeres vandret i et varmeskab ved 37 °C i 30 min.
 - Prøven vaskes med demineraliseret vand og tørres i varmeskab ved 46 °C inden næste trin. NB: vask ikke direkte i brøndene men lad vandet løbe henover dem, således at prøven ikke vaskes af glasset.
2. Acromopeptidasebehandling
 - 15 µL Acromopeptidase-opløsning overføres til hver af brøndene.
 - Amann-objektglasset lægges vandret i et 50 mL centrifugerør. I røret lægges forinden et stykke serviet fugtet med demineraliseret vand.
 - Centrifugerøret placeres vandret i et varmeskab ved 37 °C i 30 min.
 - Prøven vaskes med demineraliseret vand og tørres i varmeskab ved 46 °C.
3. Behandling med saltsyre
 - 15 µL 0,1 M HCl overføres til hver af brøndene.
 - Amann-objektglasset lægges vandret i et 50 mL centrifugerør. I røret lægges forinden et stykke serviet fugtet med demineraliseret vand.
 - Centrifugerøret placeres vandret ved stuetemperatur 10 min.
 - Prøven vaskes med demineraliseret vand og tørres i varmeskab ved 46 °C.
4. Slutteligt placeres prøven 1 min i 96 % ethanol og tørres efterfølgende.
5. Den permeabiliserede prøve opbevares i fryseren ved -20 °C indtil videre brug

D) Hybridisering

1. Til dette trin skal der forberedes en hybridiseringsbuffer, hvor indholdet af formamid svarer til de prober, som anvendes. I skemaet herunder ses opskriften for de anvendte hybridiseringsbuffer, som laves i 50 mL centrifugerør.
2. 8 µL hybridiseringsbuffer overføres til hver brønd på Amann-objektglasset
3. 1 µL (af hver) probe overføres nu til hver brønd direkte ind i bufferen (Hvis der anvendes mere end én probe i brøndene er rækkefølgen underordnet)

- Amann-objektglasset lægges vandret i centrifugerørret. I røret lægges forinden et stykke serviet f ugtet med de resterende buffer. Dette gøres for at undgå, at hybridiseringsbufferen i brøndene skal fordampe under opvarmningen.
- Centrifugerørret placeres vandret i et varmeskab ved 46 °C i minimum 90 min.

% FA	FA (μL)	MilliQ vand (μL)	5 M NaCl (μL)	1 M Tris-HCl (μL)	10 % SDS (μL)
20	400	1200	360	40	2
30	600	1000	360	40	2
35	700	900	360	40	2

E) Vask

- Vaskebufferen forberedes i minimum 30 min før hybridiseringen er afsluttet, da bufferen skal opvarmes til 48 °C i varmebad inden anvendelse. Vaskebufferen forberedes således, at den svarer til den anvendte hybridiseringsbuffer. De forskellige kemikalier overføres til 50 mL centrifugerør, som fyldes ad 50 mL med demineraliseret vand. I skemaet herunder ses opskriften for de anvendte vaskebuffer:

% FA	NaCl (mol)	EDTA (μL)	5 M NaCl (μL)	1 M Tris-HCl (μL)	10 % SDS (μL)
20	0,225	500	2150	1000	50
30	0,112	500	1020	1000	50
35	0,080	500	700	1000	50

- Efter hybridiseringen tages Amann-objektglassene forsigtigt ud af Centrifugerørrene med en pincet.
- Et par mL af vaskebufferen bruges til "forvask". Igen vaskes der ikke direkte i brøndene, i stedet lader man lidt af bufferen løbe henover dem, således at prøven ikke vaskes ud af brøndene.
- Amann-objektglasset placeres efterfølgende lodret i den opvarmede vaskebuffer i centrifugerørret. Røret sættes lodret i et varmebad ved 48 °C i 15 min.
- Efter vaskeproceduren tages Amann-objektglassene op med en pincet og vaskes forsigtig på begge sider med demineraliseret vand for at fjerne saltpartikler og vaskebuffer.

F) Fluorescensmikroskopering

Når Amann-objektglassene er helt tørre kan de undersøges i fluorescens-mikroskop. For at forbedre fluorescenssignalet lægges en dråbe citifluor i hver af brøndene og efterfølgende lægges et stort dækglass over brøndene.

BILAG 4: Forsøgsmanual til LDS

Formål

Bestemme andelen af Mycolata i det aktive slam og skum, der er levende, før, under og efter doseringen af BC-100.

Kemikalier

Til samtlige LDS-forsøg benyttes et kit kaldet L13152 LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit *10 applicator sets*. Kittet indeholder reagenserne SYTO9 farve (komponent A), Propidiumiodid (komponent B) og BacLight mounting olie (komponent C).

Udover kittet anvendes;

- Demineraliseret vand (dH₂O) til stockopløsningen.
- HyQ Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Sterilfiltreret milliQ-vand
- Aktiv-slam og skum

Materialer

- Homogenisator
- 20 mL engangssprøjte
- 0,20 µm sterilfilter
- 15 mL centrifugerør
- Eppendorfrør
- 1-5 mL pipette + spidser
- 40-200 µL pipette + sterile spidser
- 5-40 µL pipette + spidser
- Stopur
- Stanniol
- 0,22 micron polycarbonat filter
- Citifluor
- Objektglas
- Dækglas
- Immersionsolie

Fremgangsmåde

1. Forbered en stamopløsning ved at opløse pipetten med komponent A og pipetten med komponent B i 5 mL sterilfiltreret demineraliseret vand i et 15 mL centrifugerør.
2. 2 mL slam overføres til en grov homogenisator, hvor det homogeniseres blidt i 2 min. Dernæst overføres 100 µL slam fra hver af de homogeniserede prøver (hhv. slam og skum) til et eppendorfrør, hvor LDS-opløsningen tilsættes cellesuspension i forholdet 1:1.
3. LDS-opløsningen og cellesuspensionen blandes grundigt. Eppendorfrøret pakkes ind i stanniol og henstilles i 15 min.
4. Der fremstilles nu i alt tre præparater efter proceduren gennemgået i punkt 5-9.
5. 2 mL PBS-opløsning forberedes af 200 µL PBS og 1800 µL sterilfiltreret milliQ-vand.
6. Med en pipette overføres 50 µL farvet cellesuspension til 1 mL PBS-opløsning i et Eppendorfrør.
7. Dette blandes grundigt og filtreres ned på et sort 0,22 micron polycarbonat filter for at undgå baggrundsstøj fra LDS-opløsningen. Efterfølgende filtreres yderligere 1 mL PBS-opløsning gennem filteret, for at vaske overskydende farve væk.
8. Filteret overføres forsigtigt til et objektglas, hvorpå der lægges en dråbe citifluor og et dækglas.
9. Præparaterne observeres i fluorescensmikroskop, hvor andelen af levende Mycolata bestemmes for et givent område 5 steder på hvert præparat. Levende bakterier (grøn fluorescens) observeres ved en bølglængde på 480-500 nm, mens døde bakterie (rød fluorescens) observeres ved 490-500 nm. Flokbakteriernes tilstand noteres ligeledes.

BILAG 5: Forsøgsmanual til CTC

Formål

Bestemme andelen af Mycolata-filamenterne i det aktive slam og skum, der er aktive, før, under og efter doseringen af BC-100.

Kemikalier

En stamopløsning af 5-cyano-2,3-diolyt-tetrazoliumchlorid (CTC) fremstilles ved at opløse 100 mg CTC i 6,6 mL milliQ vand eller dobbelt destilleret vand. Desuden anvendes demineraliseret vand (dH₂O), aktivt-slam og skum.

Materialer

- Homogenisator
- 20 mL engangssprøjte
- 0,20 µm sterilfilter
- 50 mL centrifugerør
- 15 mL centrifugerør
- 1-5 mL pipette
- 5-40 µL pipette
- sterile pipettespidser
- Stopur
- Objektglas
- Dækglas
- Immersionsolie

Fremgangsmåde

1. 2 mL slam overføres til en grov homogenisator, hvor det homogeniseres blidt i 2 min.
2. 1 mL slam fra hver af de homogeniserede prøver (slam og skum) overføres til et 15 mL centrifugerør, hvor det fortyndes med 1 mL sterilfiltreret demineraliseret vand.
3. 10 µL CTC-opløsning overføres til centrifugerøret indeholdende de 2 mL fortyndet slamprøve.
4. Dette inkuberes i 30 minutter til 1 time ved stuetemperatur under omrøring på ca. 200 rpm. På et rystebord opnås en passende omrøring.
5. Med en pipette overføres 20 µl fra blandingen til hvert af tre objektglas, hvorpå der lægges et dækglas.
6. Prøven observeres i mikroskop, hvor andelen af aktive Mycolata (rød fluorescens) bestemmes for et givent område 5 steder på hvert præparat. Andelen af aktive bakterier findes enten direkte i fluorescensmikroskop og/eller ved billedanalyse, hvor et lysmikroskopibillede (alle filamenter) og et intensitetsbillede (aktive filamenter) fra det samme område sammenholdes. Flokbakteriernes tilstand noteres ligeledes.

BILAG 6: Metode til analyse af anlægsdesign og drift

Formål

Formålet med at analysere dimensionering og drift af ringkanalen på begge anlæg, er at vurdere, om anlæggene er overdimensionerede i forhold til den nødvendige aerobe slamalder for tilfredsstillende nitrifikation. Hvis dette er tilfældet, kan en driftsomlægning, der giver en længere anoxisk opholdstid, måske lade sig gøre. En længere anoxisk opholdstid ville samtidig gøre det muligt at omlægge driften af anlægget til også at omfatte denitrifikation. Dette ville mindske udledningen af kvælstof til recipienten og dermed forbedre kvaliteten af det rensede spildevand.

Dimensionering i forhold til nitrifikation

For at kunne beregne den aerobe slamalder (θ_{aerob}) i anlæggene, er det nødvendigt først at beregne slammassen (m_{slam}) i ringkanalen og den daglige slamproduktion (F_{SP}). Forholdet mellem disse to parametre svarer til θ_{aerob} :

$$\theta_{\text{aerob}} = m_{\text{slam}}/F_{\text{SP}}$$

Slammængden i anlæggene findes ud fra arbejdsvolumen (V_{drift}) i tanken og slamkoncentrationen ($X_{\text{aktiv-slam}}$):

$$m_{\text{slam}} = V_{\text{drift}} * X_{\text{aktiv-slam}}$$

V_{drift} er det volumen, der er taget i anvendelse, når beluftningen stoppes. Dvs. når vandstanden når et fastsat niveau, som får styringen af anlægget til at standse rotoren. I Øster Hornum Renseanlæg og Hvilsom Renseanlæg standser rotoren ved en vandstand på hhv. 1,2 m og 1 m, hvilket svarer til et arbejdsvolumen på 475 m³ og 301 m³ hhv.

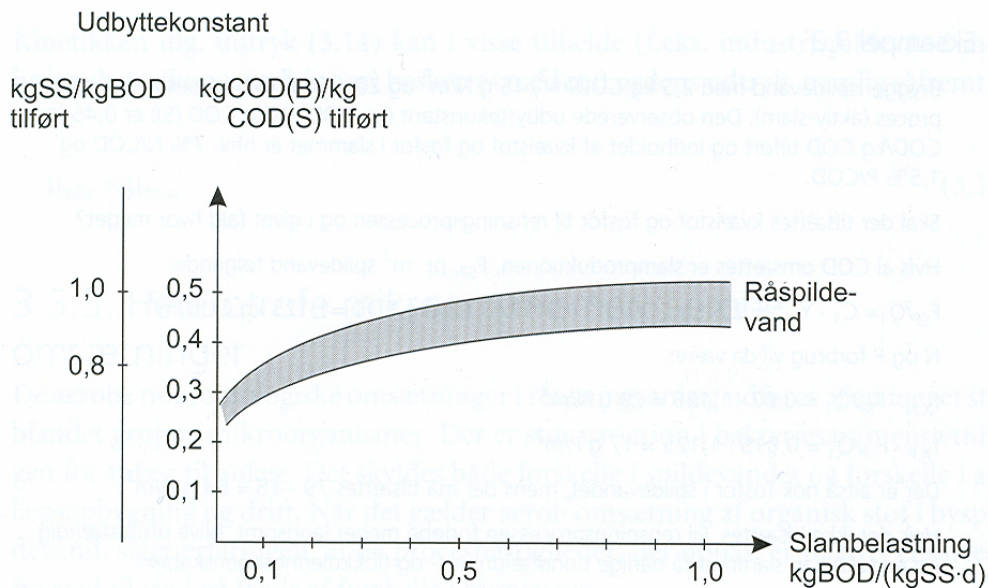
$X_{\text{aktiv-slam}}$ angivet som suspenderet stof i procestanken har typisk en værdi på 4-6 kgSS/m³, hvilket ofte afhænger af årstiden. Typisk er $X_{\text{aktiv-slam}}$ på 5 kgSS/m³ om vinteren og 3 kgSS/m³ om sommeren. Jo større slamkoncentrationen er, desto mindre tankvolumen kræves der, og derfor er dette en vigtig parameter i forbindelse med procesoptimering (Vollertsen pers. kom., 2008). Da omsætningen af bl.a. kvælstof gennem nitrifikation og denitrifikation typisk stiger i takt med en temperaturstigning (Henze et al., 2006), betyder dette, at den nødvendige slamkoncentration i anlægget er lavere om sommeren end om vinteren.

Den daglige biologiske slamproduktion beregnes på baggrund af omsat BOD i anlægget og den observerede udbyttekonstant for den biologiske slamproduktion (Y_{obs}):

$$F_{\text{SP}} = Y_{\text{obs}}(m_{\text{BOD,ind}} - m_{\text{BOD,ud}})$$

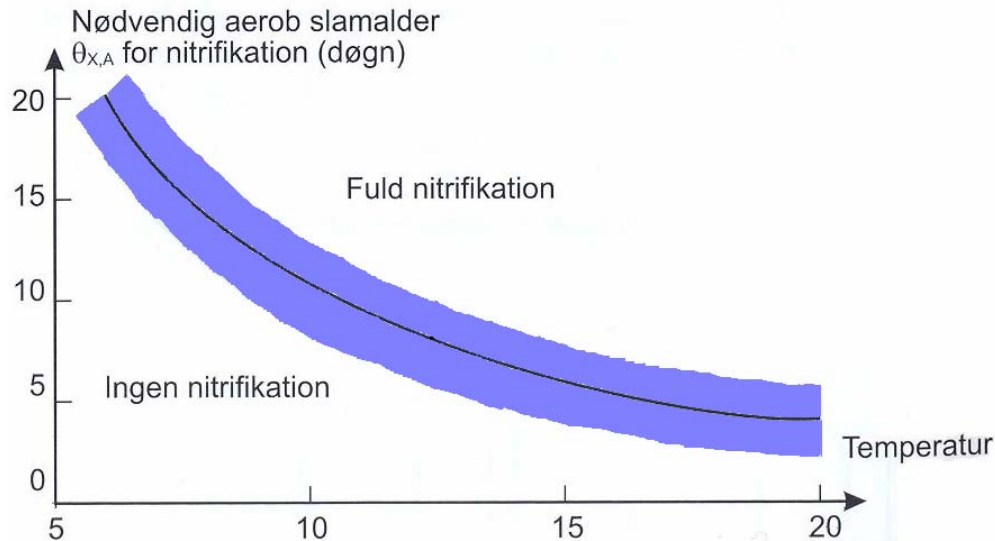
Hvor $m_{BOD,ind} - m_{BOD,ud}$ svarer til den daglige BOD-belastning i hhv. ind- og udløb. Idet stort set alt BOD oftest omsættes, regnes der her i stedet med BOD-belastningen af anlægget i indløbet.

Y_{obs} er et udtryk for, hvor stor en del af det organiske stof i spildevandet, der anvendes til ny biomasse. Y_{obs} aflæses af figur 27, som funktion af slambelastningen svarende til forholdet mellem massen af BOD, der tilledes anlægget, og massen af slam i aktiv-slam, som udledes (Henze et al., 2006). Idet slambelastningen ikke er kendt, anvendes i stedet en antaget værdi for Y_{obs} på 0,8 kgSS/kg BOD_{tilført}, hvilket normalt er et godt bud (Vollertsen pers. kom., 2008)



Figur 27: Observeret udbyttekonstant i aktiv-slamanlæg plottet mod slambelastningen (Henze et al., 2006)

Ud fra θ_{aerob} kan det vurderes, om anlægget er overdimensioneret i forhold til, hvad der er nødvendigt for at opnå en tilfredsstillende nitrifikation. For at nitrifikationen kan finde sted, er det nødvendigt med en relativ høj slamalder. Dette skyldes, at de nitrificerende bakterier vokser langsomt i forhold til mange af de øvrige bakterier i det aktive slam (Winther et al., 2004). Af figur 28, som ofte anvendes i dimensioneringssammenhænge, kan den nødvendige aerobe slamalder ved forskellige temperaturer aflæses.



Figur 28: Sammenhæng mellem temperatur og den nødvendige aerobe slamalder, som er nødvendig for at opnå en tilfredsstillende nitrifikation (Henze et al., 2006).

Driftsoplægning til denitrifikation

Både bionedbrydeligheden og mængden af det organiske stof i spildevandet har stor betydning for denitrifikationen. Hvis driften af anlægget omlægges til også at omfatte denitrifikation, kræver dette, at der er tilstrækkeligt med letomsætteligt organisk materiale i spildevandet.

Ud fra forholdet mellem BOD og COD i indløbet vurderes det, hvorvidt det organiske materiale i spildevandet er let eller svært nedbrydeligt. Her benyttes det som tommelfingerregel, at hvis $BOD/COD < 0,45$, så regnes det organiske materiale i spildevandet for svært nedbrydeligt. Er $BOD/COD > 0,5$, regnes det organiske materiale for let nedbrydeligt (Vollertsen pers. kom., 2008).

Nitrifikanterne kræver ikke organisk materiale, men mange andre bakterier vil under den aerobe opholdstid anvende det organiske materiale som kulstofkilde. Hvis der under aerobe forhold omsættes for meget letomsætteligt organisk materiale, risikeres det, at der ikke er nok til, at denitrifikationen kan finde sted. Det er derfor vigtigt, at denne pulje er tilstrækkelig til, at alle disse mikrobiologiske processer kan finde sted. For at opnå en tilfredsstillende biologisk fjernelse af kvælstof er det som udgangspunkt nødvendigt med et C/N-forhold på minimum 10-12 g C/g N.

