

**Nitrifikationshæmningstest ved brug af ISO
9509 – Del 2**

Referencelaboratoriet

Agern Allé 11
2970 Hørsholm

Tel: 4516 9200
Fax: 4516 9292
E-mail: mwn@dhi.dk
Web: www.dhi.dk

Miljøstyrelsen

Nitrifikationshæmningstest ved brug af ISO 9509 – Del 2

Referencelaboratoriet

**Rapport
Februar 2003**

Projektleder: Margrethe Winther-Nielsen
Projektmedarbejder: Connie Seierø

Sagsnr.: 51202
Dato: 2003.02.10/TKH

Indholdsfortegnelse

1.	Indledning.....	3
2.	Gennemført undersøgelse og vurdering.....	3
2.1	Slamkoncentrationens betydning for resultatet af en nitrifikationshæmningstest	3
2.2	Ammonium/ammoniak-koncentration	4
3.	Databehandling af testresultater	5
4.	Resultater og diskussion.....	5
4.1	Slamkoncentrationens effekt	5
4.2	Ammonium/ammoniak-koncentrationens betydning	7
5.	Sammenfattende konklusion	8
6.	Referencer.....	8
Bilag 1	Testresultater fra forsøg med slam i flere koncentrationer.....	10
Bilag 2	Udkast til revideret DS/EN ISO 9509	23

1. Indledning

Undersøgelse af kemikaliers og spildevands effekt på nitrifikationen i aktivt slam på danske laboratorier foretages generelt ved anvendelse af to metoder:

- ISO 9509 /1/
- MINNTOX (Screeningsmetode) /2, 3/

Metoderne anvendes imidlertid i forskellige modificerede udgaver på laboratorierne. Med det formål at etablere et grundlag for udarbejdelse af ensartede procedurer iværksatte Miljøstyrelsens Referencelaboratorium i efteråret 2000 en vurdering af de identificerede svagheder i først og fremmest ISO 9509.

Vurderingen er gennemført i to perioder:

- oktober – december 2000
- november – december 2001

Vurderingsresultaterne fra den første periode er rapporteret særskilt i følgende rapport til Miljøstyrelsen: Nitrifikationshæmningstest ved brug af ISO 9509 – Del 1, Referencelaboratoriet /4/. Vurderingen omfattede følgende emner: mediasammensætning, iltkoncentration, ammonium/ammoniak-koncentration, prøveopbevaring samt optøning af delprøver udtaget til nitrit/nitrat-analyse og referencestoffer. Denne rapport beskriver tillige baggrunden for iværksættelse af vurderingen og præsenterer de hyppigst anvendte modifikationer af ISO 9509.

Den gennemførte vurdering i november-december 2001, der er præsenteret i denne rapport indeholdt følgende: undersøgelse af slamkoncentrationens effekt og afsluttende vurdering af ammonium/ammoniak-koncentrationens betydning.

De gennemførte undersøgelser og vurderinger skulle danne grundlag for udarbejdelse af et forslag til en revision af ISO 9509.

2. Gennemført undersøgelse og vurdering

2.1 Slamkoncentrationens betydning for resultatet af en nitrifikationshæmningstest

ISO 9509 /1/ foreskriver anvendelse af en slamkoncentration på ca. 1,5 g SS/L i testglasset, og at nitrifikationshastigheden helst skal ligge i området 2 til 6 mg N/g SS/time. Arvin *et al.* /2/ angiver, at udførelse af MINNTOX foretages med anvendelse af en slamkoncentration på ca. 4 g SS/L, hvis den specifikke nitrifikationshastighed er 1-2 mg N/g SS/time. Den generelle procedure på flere af de danske laboratorier har været at tilpasse slamkoncentration til slammets nitrificerende hastighed. Der er således typisk benyttet en relativt høj slamkoncentration for slam med lave nitrifikationshastigheder og en lav slamkoncentration for slamtyper med høje hastigheder.

Generelt antages det, at sorption eller binding af et toksisk stof til f.eks. slampartikler vil medføre en reduktion af stoffets toksiske effekt. Det er ofte kun den del af stoffet i en testbeholder, der er på opløst form eller den såkaldte biotilgængelige del, der vil have en effekt på testorganismen. Det kan derfor forventes, at resultatet af en nitrifikationshæmningstest med et sorberende stof vil være stærkt afhængig af den anvendte slamkoncentration.

Slamkoncentrationens betydning blev vurderet ved at udføre tre paralleltest med anvendelse af aktivt slam fra Spildevandscenter Avedøre I/S i følgende koncentrationer: 1; 2,5 og 5 g SS/L. Isorchem 113/S-Na fra CONDEA Augusta S.p.A. med 20,3% (w/w) lineær alkylbensulfonat (LAS) blev anvendt som model for et stof, der sorberer til slampartikler. Stoffet er også bionedbrydeligt.

LAS er et overfladeaktivt stof, og i en test med stoffet vil det kunne forårsage en kraftig skumning i testblandingen under beluftningen i de åbne testbeholdere, der anvendes i ISO 9509. Den kraftige skumning kan gøre testningen vanskelig og bl.a. medføre tab af testblanding. Testen blev derfor udført i lukkede beholdere efter princippet i MINNTOX /2/ med følgende modifikationer:

- Der blev anvendt et forhold på 2:1 mellem gas- og væskevolumen i testglas
- Atmosfæren i glassene blev udskiftet med ren oxygen ved testforløbets start for at sikre, at oxygenindholdet ikke blev begrænsende for nitrifikationen. Iltkoncentrationen blev kontrolleret efter endt test i glas med teststof.
- Mediesammensætningen var som angivet i ISO 9509 /1/.

Testen blev for hver af slamtyperne endvidere udført med dobbeltbestemmelser og inkluderede 6 kontrolglas uden tilsætning af teststof. Der blev afsluttet 2 stk. kontrolglas og 2 stk. testglas for hver testet koncentration af Isorchem efter 10, 90 og 180 minutter. Isorchem blev testet i følgende koncentrationer: 50, 150, 500, 1500 og 5000 mg/L.

Koncentrationen af slam blev bestemt efter DS 207 /5/. Kemiske analyser af nitrit- og nitratkvælstof blev udført efter DS 223 /6/.

2.2 Ammonium/ammoniak-koncentration

Ammonium/ammoniak-koncentrationens effekt på nitrifikationen blev undersøgt i oktober-december 2000 ved anvendelse af 2 forskellige slamtyper. Undersøgelserne, der blev udført med modificeret ISO 9509 og ved pH på 7,9-9,1, viste begyndende hæmningseffekter ved en ammonium/ammoniak-koncentration på 100 mg N/L. Ved denne koncentration blev der således fundet effekter på 20% og 24% samt 4% og 10% i slam fra henholdsvis Nivå Renseanlæg og Renseanlæg Lynetten.

I en tidligere undersøgelse med en modificeret udgave af MINNTOX resulterede 100 mg ammonium/ammoniak-N/L i en hæmningseffekt på 2% ved pH på 7,3-8,1. Denne undersøgelse blev udført med slam fra Frederikssund Renseanlæg /7/.

På dette grundlag blev det anbefalet at anvende 100 mg N/L som øvre grænse for $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3\text{-N}$ -koncentrationen i en nitrifikationshæmningstest, indtil der foreligger et større datagrundlag for forskellige slamtypers følsomhed over for ammonium/ammo-

niak. Der er i den foreliggende rapport foretaget en yderligere vurdering af ammonium/ammoniakkoncentrationens betydning ved gennemgang af foreliggende litteratur.

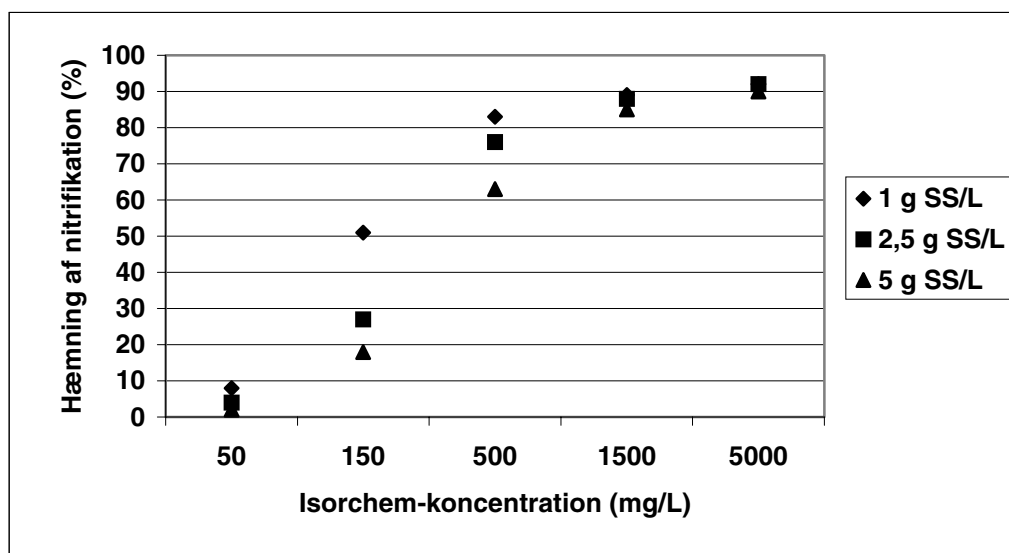
3. Databehandling af testresultater

Nitrifikationshastigheden i testbeholderne blev bestemt som $\text{mg NO}_2^- + \text{NO}_3^- \text{-N-dannelse}$ pr. time relateret til den tilsatte mængde suspenderet slamtørstof ($\text{mg NO}_2^- + \text{NO}_3^- \text{-N/g SS/time}$). Beregningerne blev udført ved brug af lineær regression under anvendelse af $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- \text{-N-koncentrationerne}$ bestemt efter 10, 90 og 180 minutter. Den observerede hæmning af nitrifikationen i testbeholdere med teststof blev herefter angivet i procent af nitrifikationshastigheden i kontrollerne. De testkoncentrationer, der medførte 10% (EC10), 50% (EC50) og 90% (EC90) hæmning blev estimeret ved hjælp af computerprogrammet TOXEDO /8/.

4. Resultater og diskussion

4.1 Slamkoncentrationens effekt

Testresultaterne fremgår af bilag 1 og figur 4.1.



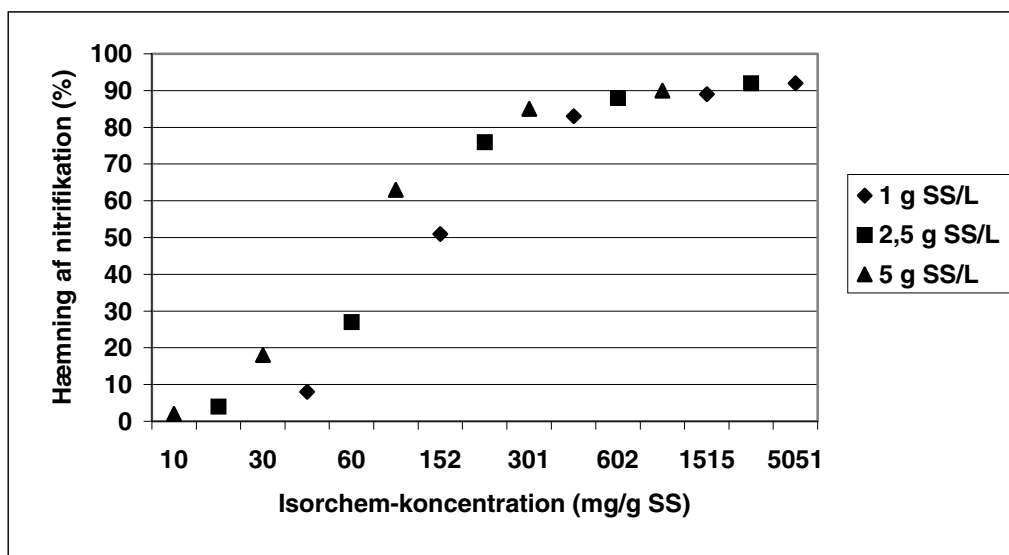
Figur 4.1 Hæmning af nitrifikation som funktion af testkoncentrationen for forskellige slamkoncentrationer

Resultaterne viser, at hæmningseffekten som forventet aftager med stigende slamkoncentration. Forskellene i hæmningseffekter er mest udtalt for koncentrationer, der giver anledning til effekter i området ca. 20% til ca. 80%. Den største forskel blev fundet ved test af 150 mg Isorchem/L, hvor der ved test med 1 g SS/L blev målt en

effekt på 51%, mens test med 5 g SS/L gav en effekt på 18%. LAS, der er den aktive komponent i Isorchem, bindes til slampartikler, men kan også nedbrydes under testen. Det er sandsynligt, at de registrerede effektforskelle som funktion af slamkoncentrationen i testen skyldes en kombination af disse to parametre.

Vigtigheden af slam- eller biomassekoncentrationen er blevet fremhævet af flere /f.eks. 9, 10, 11/. Det er også blevet nævnt, at forskellen i hæmningseffekter ved brug af forskellige slamkoncentrationer ville kunne udlignes ved at normalisere stofkoncentrationen til slamkoncentrationen. Figur 4.2 viser de opnåede testresultater for Isorchem som funktion af stofkoncentrationen pr. g SS. Det fremgår heraf, at en normalisering til slamkoncentrationen gjorde forskellen mindre, men normaliseringen gav ikke en fuldstændig udligning i forskellene på hæmningseffekter. Tilsvarende resultater blev fundet af Jönsson /12/ ved test af allylthiourinstof (ATU) og zink (Zn) i testglas med forskellige slamkoncentrationer.

Test af metanol ved forskellige slamkoncentrationer gav imidlertid et andet billede /12/. I dette tilfælde blev der ikke registreret væsentlige forskelle i hæmningseffekterne i to testserier med forskellige slamkoncentrationer. Normalisering af metanolkoncentrationen til slamkoncentrationen udtrykt som g metanol/g VSS (VSS = Volatile Suspended Solid) resulterede i en signifikant forskel på hæmningseffekter for samme stof/slam-forhold ved test med lav (1 g VSS/L) og høj (3 g VSS/L) slamkoncentration. F.eks. gav en testkoncentration på ca. 0,12 g metanol/g VSS hæmningseffekter på ca. 20% og ca. 80% ved test med slamkoncentrationer på henholdsvis 1 og 3 g VSS/L.



Figur 4.2 Hæmning af nitrifikation som funktion af forholdet mellem teststof og slam

Selvom det kan antages, at både ATU og metanol forelår på opløst form i det anvendte testsystem, havde slamkoncentrationen forskellig indvirkning på testresultatet for de to stoffer. De konstaterede forskelle kan skyldes, at stofferne har forskellige virkemekanismer på nitrificerende bakterier. Metanol er således fundet at være en kompetitiv inhibitor, mens ATU er en ikke-kompetitiv inhibitor /13/.

Det kan konkluderes, at den anvendte slamkoncentration i en nitrifikationshæmningstest indvirker på den opnåede hæmningseffekt. For de hæmmende stoffer, der blev testet af Referencelaboratoriet og af Jönsson /12/ var hæmningen imidlertid ikke proportional med slamkoncentrationen. Det anbefales derfor fortsat at udtrykke hæmningseffekten som funktion af stofkoncentration pr. volumeenhed.

Resultaterne i bilag 1 viser endvidere, at nitrifikationshastigheden i kontrolglassene aftog med stigende slamkoncentration fra 3,33 mg N/g SS/time ved 1 g SS/L til 2,80 mg N/g SS/time ved 5 g SS/L. Det observerede fald i hastigheden kan skyldes den reduktion i pH, som blev konstateret som funktion af slamkoncentrationen. Efter 180 minutters testtid blev der således målt pH på 6,7 og 7,4-7,5 i kontrolglas med henholdsvis 5 g SS/L og 1 g SS/L.

De opnåede resultater indikerer, at det kunne være relevant at eliminere slamkoncentrationens effekt ved at fastsætte grænser for den tilladelige slamkoncentration i en test. For at minimere effekten af variationer i slamkoncentration bør anbefalingerne i ISO 9509 vedrørende slamkoncentrationen følges. ISO 9509 anbefaler en slamkoncentration i testglas på ca. 1,5 g SS/L /1/. Med de anbefalede grænser for nitrifikationshastigheden på 2-6 mg N/g SS/t vil denne slamkoncentration resultere i nitrit/nitrat-koncentrationer på 9-27 mg N/L i kontrolglassene efter 3 timers test.

Det skal dog fremhæves, at det kan være relevant at afvige fra den anbefalede slamkoncentration. Det kan f.eks. være tilfældet, hvis effekten af et stof eller spildevand ønskes vurderet for et specifikt renseanlæg ved den aktuelle slamkoncentration.

4.2 Ammonium/ammoniak-koncentrationens betydning

De høje pH-værdier der ofte opstår ved test med ISO 9509 under kraftig beluftning, øger risikoen for hæmning forårsaget af substratet ammonium/ammoniak. Giftvirkningen forårsages primært af det ikke-ioniserede ammoniak. Da ligevægten $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ forskydes mod venstre med stigende pH, vil hæmningseffekten være en funktion af pH, når ammonium/ammoniak-koncentrationer og andre testparametre som f.eks. temperaturen holdes konstante. Ifølge Anthonisen *et al.* /14/ vil ammoniumoxidationen være 100% hæmmet ved 150 mg NH_3 -N/L, hvorimod der ikke vil være hæmning ved 10 mg NH_3 -N/L. For pH 7,5 og 9,0, som er typiske yderområder ved test med ISO 9509 vil koncentrationen af ammoniak være 10 mg N/L, når den totale $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -N-koncentration er henholdsvis ca. 500 og ca. 40 mg N/L. Grænsen for hæmningseffekt ligger således mellem ca. 40 og ca. 500 mg $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -N/L for pH mellem 9 og 7,5.

Pedersen og Jansen /15/ fandt, at ammonium/ammoniak-koncentrationer op til 300 mg N/L ikke hæmmede nitrifikationen. En undersøgelse af Jönsson /12/ viste, at en ammonium/ammoniak-koncentration på 75 mg N/L gav hæmningseffekter under detektionsgrænsen (<10%) ved både pH 7 og pH 8,5. Ved en koncentration på 250 mg N/L var hæmningseffekten imidlertid betydelig med effekter på ca. 25% og ca. 35% ved pH på henholdsvis 7 og 8,5.

På baggrund af de refererede undersøgelser beskrevet i litteraturen og undersøgelserne lavet af Referencelaboratoriet anbefales det at anvende en maksimumsgrænse for ammonium/ammoniak på 75 mg N/L i testglas.

5. Sammenfattende konklusion

Den gennemførte undersøgelse af slamkoncentrationens betydning for resultatet af en nitrifikationshæmningstest viste, at den registrerede hæmningseffekt af et sorberende og bionedbrydeligt stof som LAS faldt med stigende slamkoncentration i testglas fra 1 til 5 g SS/L. Undersøgelser af zink og ATU, som er beskrevet i litteraturen viser samme afhængighed af slamkoncentrationen, hvorimod der ikke blev fundet forskel i effekten af metanol ved en slamkoncentration på 1 og 3 g VSS/L. Normalisering af stofkoncentrationerne i forhold til slamkoncentrationen udlignede ikke forskellene i hæmningseffekter for LAS, zink og ATU. Det kan konkluderes, at den anvendte slamkoncentration i en nitrifikationshæmningstest indvirker på hæmningseffekten. Det anbefales at benytte en slamkoncentration på ca. 1,5 g SS/L i testglas jf. ISO 9509. Valget af slamkoncentration kan naturligvis tilpasses formålet med testen. Det kan f.eks. være relevant at udføre testen med en slamkoncentration, der er betydeligt højere end 1,5 g SS/L, hvis effekten af et stof eller spildevand ønskes vurderet for et specifikt renseanlæg ved den aktuelle slamkoncentration.

Ammonium/ammoniak-koncentrationens betydning blev vurderet på basis af tidligere undersøgelser lavet af Referencelaboratoriet samt undersøgelser beskrevet i litteraturen. Effekten af ammonium/ammoniak er stærkt afhængig af pH i testblandingen. Grænsen for, hvornår ammonium/ammoniak-koncentrationer begynder at virke hæmmende, varierer fra ca. 40 mg N/L til ca. 500 mg N/L ved de typisk anvendte pH-niveauer i nitrifikationshæmningstest. Test med modificeret ISO 9509 ved pH 8-9 viste en hæmningseffekt på 4-24% ved 100 mg N/L, mens 75 mg N/L ikke gav effekt ved pH 8,5 i en test udført med en modificeret udgave af MINNTOX af Jönsson /12/. Det anbefales på denne baggrund at sætte maksimumsgrænsen for ammonium/ammoniak-koncentrationen i et testglas til 75 mg N/L.

På grundlag af anbefalingerne i denne rapport, den tidligere udarbejdede delrapport over undersøgelserne udført i 2000 /4/ samt erfaringer fra tidligere vurderinger af ISO 9509 er der udarbejdet et dansk tillæg med modifikationer til ISO 9509 (bilag 2). Det er målet, at dette tillæg skal anvendes på danske miljølaboratorier for at sikre ensartede testprocedurer.

6. Referencer

- /1/ DS/EN ISO 9509 (1996): Vandundersøgelse. Nitrifikationshæmning for kemikalier og spildevand. Bestemmelse med aktiveret slam.
- /2/ Arvin, E, S. Dyreborg, C. Menck & J. Olsen (1994): A mini-nitrification test for toxicity screening, *MINNTOX*. *Water Res.* 28(9):2929-2931.

- /3/ Naturvårdsverket (1995): Screeningsmetod för bestämning av nitrifikationshämning vid drift av kommunala avloppsreningsverk. SKARV-projektet. Naturvårdsverkets rapport 4424. April 1995.
- /4/ Winther-Nielsen, M, K. Stuckert og C. Seierø (2002). Nitrifikationshæmningstest bed brug af ISO 9509. Del 1. Referencelaboratoriet. Rapport til Miljøstyrelsen. DHI – Institut for Vand og Miljø. Januar 2002.
- /5/ DS 207 (1985): Vandundersøgelse. Suspenderet stof og gløderest.
- /6/ DS 223 (1975): Vandundersøgelse. Bestemmelse af summen af nitrit- og nitratnitrogen.
- /7/ Winther-Nielsen, M. og J. C. Jansen (1992): Screening af industrispildevand for nitrifikationshæmning. Arbejdsrapport vedrørende SKARV-projekt – nitrifikationshæmning. VKI. December 1992.
- /8/ VKI (1999): TOXEDO, version 1.5. Program for statistical estimations of EC values, based on experimental data from ecotoxicological assays.
- /9/ Fitzegerald, G.P. (1964): Factors in the testing and application of algicides. *Appl. Microbiol.* 12, 3:247-253.
- /10/ Nay, M.W., C.W. Randall and P.H. King (1974): Biological treatability of trinitrotoulene manufacturing wastewater. *J. WPCF*, 46, 3:485-497.
- /11/ Randall, C.W. and D. Buth (1984): Nitrite build-up in acitivated sludge resulting from temperature effects. *J. WPCF*, 56, 9:1045-1049.
- /12/ Jönsson, K. (2001): Inhibition of Nitrification in Municipal Watsewater – Sources, Effects, Evaluation and Remedies. PhD thesis, Lund University 2001. 159 pages.
- /13/ McCarthy, G.W. (1999): Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils*, 29:1-9.
- /14/ Anthonisen, A.C., R.C. Loehr, T.B.S. Prakasam and E.G. Srinath (1976): Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Jour. WPCF*, 48, 5:835-852.
- /15/ Pedersen, B.M. and J.C. Jansen (1992): Treatment of leachate-polluted groundwater in an aerobic biological filter. *European Water Pollution Control*, 4, 4:40-45.

Bilag 1 Testresultater fra forsøg med slam i flere koncentrationer

1,0 g SS/L

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 1,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : Kontrol

SS : 0.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.71 A	-	-
10.0	-	1.79 A	-	-
10.0	-	1.85 A	20.9	7.9
90.0	-	6.03 A	20.7	7.5
90.0	-	6.23 A	-	-
90.0	-	6.44 A	-	-
180.0	43.60	11.1 A	20.8	7.5
180.0	-	11.2 A	20.7	7.5
180.0	-	11.1 A	20.9	7.4

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N A	1.25	0.05	1.00	3.33	-	9

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 1,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 50 mg LAS/L

SS : 0.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.68 A	20.9	8.0
10.0	-	1.72 A	-	-
90.0	-	6.07 A	20.9	7.6
90.0	-	6.09 A	-	-
180.0	-	10.3 A	-	-
180.0	-	10.4 A	21.4	7.5

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N A	1.30	0.05	1.00	3.08	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 1,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 150 mg LAS/L

SS : 0.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.69 A	21.1	8.0
10.0	-	1.74 A	-	-
90.0	-	4.64 A	20.9	7.6
90.0	-	4.70 A	-	-
180.0	-	6.37 A	-	-
180.0	-	6.21 A	20.7	7.6

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N A	1.73	0.03	0.96	1.62	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 1,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 500 mg LAS/L

SS : 0.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.57 A	21.2	8.0
10.0	-	1.58 A	-	-
90.0	-	2.52 A	-	-
90.0	-	2.51 A	20.9	7.8
180.0	-	3.17 A	-	-
180.0	-	3.21 A	20.6	7.8

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N A	1.54	0.01	0.98	0.57	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 1,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 1500 mg LAS/L

SS : 0.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.65 A	21.4	8.0
10.0	-	1.55 A	-	-
90.0	-	2.24 A	-	-
90.0	-	2.21 A	-	-
180.0	-	2.69 A	20.6	7.8
180.0	-	2.66 A	-	-

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	1.58	0.01	0.98	0.38	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 1,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 5000 mg LAS/L

SS : 0.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.61 A	21.1	8.0
10.0	-	1.61 A	-	-
90.0	-	2.06 A	-	-
90.0	-	2.06 A	-	-
180.0	-	2.37 A	20.8	7.9
180.0	-	2.36 A	-	-

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	1.60	0.00	0.98	0.27	-	6

Inhibition of the nitrification of activated sludge from Avedøre Spildevandscenter, 1.0 g SS/L with LAS

Statistical parameters calculated from continuous responses based on continuous mean

Test type: Nitrification Inhibition Test

3 doses and 3 responses have been used during calculations

Control values

Concentration in mg/L	Relative nitrification mg N/g SS * h	Inhibition in per cent
Control 1	3.33	-
Control mean	3.33	0

Experimental data

Concentration in mg/L	Relative nitrification mg N/g SS * h	Inhibition in per cent
50	3.08	8
150	1.62	51
500	0.57	83
1500 *	0.38	89
5000 *	0.27	92

* Concentration not included in the statistical calculation

EC-values and limits of the 95% confidence interval

y(EC)	LCL	EC(yo)	UCL
10	-	<50	-
50	-	159	-
90	-	640	-

2,5 g SS/L

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 2,5 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, $\text{NH}_4\text{-N}$ og NaHCO_3 i slamsusp.
 Karakteristika : Kontrol

SS : 2.49 g/L

Tid	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$	TE	pH
10.0	-	1.86 A	20.9	7.8
10.0	-	2.22 A	21.0	7.9
10.0	-	2.42 A	21.1	7.9
90.0	41.70	12.5 A	20.9	7.3
90.0	-	12.2 A	20.9	7.3
90.0	-	12.5 A	20.9	7.3
180.0	32.00	23.8 A	20.9	7.1
180.0	-	23.7 A	-	-
180.0	-	24.2 A	-	-

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r^2	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ A	0.89	0.13	1.00	3.08	-	9

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 2,5 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, $\text{NH}_4\text{-N}$ og NaHCO_3 i slamsusp.
 Karakteristika : 50 mg LAS/L

SS : 2.49 g/L

Tid	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$	TE	pH
10.0	-	1.83 A	-	-
10.0	-	1.95 A	21.1	7.9
90.0	-	12.3 A	-	-
90.0	43.50	12.3 A	20.9	7.3
180.0	-	22.8 A	-	-
180.0	-	22.8 A	21.1	7.1

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r^2	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ A	0.86	0.12	1.00	2.96	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 2,5 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 150 mg LAS/L

SS : 2.49 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.96 A	-	-
10.0	-	2.06 A	20.9	7.9
90.0	-	10.9 A	-	-
90.0	-	10.9 A	21.0	7.3
180.0	-	17.7 A	-	-
180.0	-	18.1 A	20.9	7.2

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	1.58	0.09	0.99	2.24	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 2,5 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 500 mg LAS/L

SS : 2.49 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.84 A	-	-
10.0	-	1.85 A	21.0	7.9
90.0	-	5.15 A	20.9	7.5
90.0	-	4.95 A	-	-
180.0	-	7.18 A	-	-
180.0	-	7.05 A	20.5	7.5

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	1.79	0.03	0.97	0.74	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 2,5 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 1500 mg LAS/L

SS : 2.49 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.70 A	-	-
10.0	-	1.80 A	21.1	7.9
90.0	-	3.19 A	21.0	7.6
90.0	-	3.22 A	-	-
180.0	-	4.42 A	-	-
180.0	-	4.36 A	20.8	7.6

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	1.67	0.02	0.99	0.37	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 2,5 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 5000 mg LAS/L

SS : 2.49 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	1.72 A	-	-
10.0	-	1.75 A	21.2	8.0
90.0	-	2.59 A	21.0	7.7
90.0	-	2.66 A	-	-
180.0	-	3.46 A	-	-
180.0	-	3.43 A	20.7	7.7

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	1.66	0.01	1.00	0.24	-	6

Inhibition of the nitrification of activated sludge from Avedøre Spildevandscenter, 2.5 g SS/L with LAS

Statistical parameters calculated from continuous responses based on continuous mean

Test type: Nitrification Inhibition Test

3 doses and 3 responses have been used during calculations

Control values

Concentration in mg/L	Relative nitrification mg N/g SS * h	Inhibition in per cent
Control 1	3.08	-
Control mean	3.08	0

Experimental data

Concentration in mg/L	Relative nitrification mg N/g SS * h	Inhibition in per cent
50	2.96	4
150	2.24	27
500	0.74	76
1500 *	0.37	88
5000 *	0.24	92

* Concentration not included in the statistical calculation.

EC-values and limits of the 95% confidence interval

y(EC)	LCL	EC(yo)	UCL
10	69	80	91
50	244	261	280
90	745	852	1003

5,0 g SS/L

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 5,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, $\text{NH}_4\text{-N}$ og NaHCO_3 i slamsusp.
 Karakteristika : Kontrol

SS : 4.99 g/L

Tid	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$	TE	pH
10.0	-	3.61 A	21.3	7.7
10.0	-	3.55 A	-	-
10.0	-	3.73 A	21.3	7.7
90.0	-	23.3 A	20.5	7.1
90.0	-	23.4 A	20.7	7.1
90.0	-	23.6 A	20.3	7.1
180.0	14.2	42.9 A	21.1	6.7
180.0	-	43.8 A	21.1	6.7
180.0	-	42.9 A	21.1	6.7

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r^2	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ A	1.72	0.23	1.00	2.80	-	9

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 5,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, $\text{NH}_4\text{-N}$ og NaHCO_3 i slamsusp.
 Karakteristika : 50 mg LAS/L

SS : 4.99 g/L

Tid	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$	TE	pH
10.0	-	3.29 A	-	-
10.0	-	3.46 A	21.4	7.7
90.0	-	22.9 A	20.7	7.0
90.0	-	23.2 A	-	-
180.0	-	42.1 A	-	-
180.0	18.8	42.1 A	20.9	6.7

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r^2	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ A	1.61	0.23	1.00	2.73	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 5,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 150 mg LAS/L

SS : 4.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	3.37 A	21.3	7.7
10.0	-	3.46 A	-	-
90.0	-	20.9 A	20.5	7.1
90.0	-	20.9 A	-	-
180.0	-	36.0 A	-	-
180.0	28.5	35.7 A	21.0	6.7

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N A	2.30	0.19	0.99	2.29	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 5,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 500 mg LAS/L

SS : 4.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	3.53 A	21.5	7.7
10.0	-	3.39 A	-	-
90.0	-	13.4 A	20.4	7.3
90.0	-	14.0 A	-	-
180.0	-	18.4 A	21.1	7.0
180.0	38.4	18.2 A	-	-

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N A	3.74	0.09	0.94	1.04	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 5,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 1500 mg LAS/L

SS : 4.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	2.67 A	21.4	7.8
10.0	-	2.70 A	-	-
90.0	-	6.52 A	-	-
90.0	-	6.50 A	20.5	7.8
180.0	-	8.81 A	-	-
180.0	-	8.78 A	21.0	7.1

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	2.66	0.04	0.97	0.43	-	6

Sagsnummer : 51202
 Forsøg udført : 20011218
 Identifikation : Slamkonc.: 5,0 g SS/L
 Slam : Aktiv slam fra Avedøre Spildevandscenter
 Medium : Postevand, NH₄-N og NaHCO₃ i slamsusp.
 Karakteristika : 5000 mg LAS/L

SS : 4.99 g/L

Tid	NH ₃ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TE	pH
10.0	-	2.27 A	21.1	7.9
10.0	-	2.30 A	-	-
90.0	-	4.63 A	20.5	7.6
90.0	-	4.66 A	-	-
180.0	-	6.02 A	-	-
180.0	-	6.23 A	20.9	7.4

Regressionsanalyse

Mærke	a	b	r ²	Hast. mgN/gSS*h	Norm.Hast. mgN/gVSS*h	No
NO ₂ +NO ₃ -N						
A	2.26	0.02	0.97	0.27	-	6

Inhibition of the nitrification of activated sludge from Avedøre Spildevandscenter, 5.0 g SS/L with LAS

Statistical parameters calculated from continuous responses based on continuous mean

Test type: Nitrification Inhibition Test

3 doses and 3 responses have been used during calculations

Control values

Concentration in mg/L	Relative nitrification mg N/g SS * h	Inhibition in per cent
Control 1	2.80	-
Control mean	2.80	0

Experimental data

Concentration in mg/L	Relative nitrification mg N/g SS * h	Inhibition in per cent
50	2.73	2
150	2.29	18
500	1.04	63
1500 *	0.43	85
5000 *	0.27	90

* Concentration not included in the statistical calculation.

EC-values and limits of the 95% confidence interval

y(EC)	LCL	EC(yo)	UCL
10	<50	88	165
50	231	387	592
90	979	1709	>5000

Bilag 2 Udkast til revideret DS/EN ISO 9509

DS/EN ISO 9509: 1989 (E)

1. udgave

Godkendt: 1996-05-24

Vandundersøgelse

Nitrifikationshæmning for kemikalier og spildevand

Bestemmelse med aktiveret slam

Water Quality – Method for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge
micro-organisms by chemicals and waste water

Water quality – Method for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganism by chemicals and waste waters

WARNING – Activated sludges may contain pathogenic organisms, therefore take appropriate precautions when handling them.

Handle toxic test substances and those with unknown properties with care.

1 Scope

1.1 This Standard specifies a method for assessing the short-term inhibitory effects of test substances on nitrifying bacteria in activated sludge and is based on the International Standard ISO 9509 (1989). The inhibitory effects are estimated over an exposure period of 3 h.

1.2 The method is suitable for use with nitrifying activated sludge from domestic sewage. It is also possible to use nitrifying sludges derived from synthetic sewage.

1.3 The method is applicable to non-volatile chemical substances, which are soluble in water and also to waste waters. It is possible to use insoluble substances, if care is taken to ensure as much homogeneity as possible.

1.4 It is important to stress that sludges from different sources respond differently to a given concentration of an inhibitor and this is probably due, at least in part, to reaction between the inhibitor and components of the sludge resulting in a partial nullifying of the toxic effect. Also, since the test lasts only 3 h, it must be borne in mind that any inhibitory effects may diminish, or increase, over a longer period, e.g. in the continuous activated sludge system.

2 Normative references

The following standards contain provisions, which, through reference in this text, constitute provisions of the International Standard ISO 9509. At the time of publication, the editions indicated were valid. All standards are subject to revision, and parties to agreements based on the International Standard ISO 9509 are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of the standards indicated below. Member of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 6107-1: 1996, *Water quality – Vocabulary – Part 1*.

ISO 6107-3: 1993, *Water quality – Vocabulary – Part 3*.

ISO 5667-16: 1998, *Water quality – Sampling – Part 16*

3 Definitions

For the purposes of this Standard, the following definitions apply.

3.1 Test substance: Pure chemicals, mixtures, chemical products and waste waters.

3.2 Activated sludge: Accumulated biological mass (floc) produced in the treatment of waste water by the growth of bacteria and other micro-organisms in the presence of dissolved oxygen. [ISO 6107-1.]

3.3 Mixed liquor suspended solids (MLSS): The concentration of solids, expressed in a specified dried form, in the mixed liquor. [ISO 6107-3.]

NOTE – In this Standard, the MLSS are determined after filtration of a known volume and drying at about 100°C. The MLSS are expressed in milligrams per liter or grams per liter.

3.4 EC50 and EC20: Concentration of test substance giving a calculated or interpolated inhibition of nitrification of 50 % and 20 %, respectively, compared with a control containing no test material.

3.5 Nitrification: The oxidation of ammonium salts by bacteria. Usually, the end product of such an oxidation is nitrate. [ISO 6170-1.]

NOTE – Nitrites may be formed as intermediate products.

4 Principle

Performance of the test at a constant temperature, usually between 20°C and 25°C, in an atmosphere free from dust and toxic vapors. Parallel aeration of a nitrifying sludge in the presence and absence of test material and assessment of the difference in concentration of oxidized nitrogen (nitrite N plus nitrate N) produced by the oxidation of ammonium salts. Calculation of the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms by the test material.

5 Reagents and materials

5.1 Water, deionized or distilled.

REVISION OF INTERNATIONAL STANDARD

DS/EN ISO 9509: 1989 (E)

5.2 Nitrifying activated sludge

Obtain a portion of sludge from a nitrifying treatment plant receiving domestic sewage or from a laboratory-scale plant treating domestic or synthetic sewage. Maintain the sludge in an aerobic condition and preferably use within 24 h of collection.

Before use, centrifuge the sludge (e.g. 1 100 g during 5 min) and discard the supernatant liquid. Wash the residue with an equal volume of water (5.1), dilute the resulting mixture with ten times the volume of medium (5.3), re-centrifuge and again discard the supernatant liquid. Finally, resuspend the sludge in an appropriate volume of water (5.3) to give the required concentration of mixed liquor suspended solids (e.g. 4 g/l) and aerate until use.

5.3 Medium

Dissolve 5.04 g of sodium hydrogencarbonate (NaHCO_3) and 2.65 g of ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ in 1 liter of water (5.1).

NOTE – This medium - when diluted 1 : 10, contains 56 mg/l of N and has a pH value of about 7.6. It allows the production of at least 25 mg/l of oxidized nitrogen without changing the pH.

5.4 Reference inhibitor

Dissolve 200 mg of allylthiourea (ATU) in 200 ml of water (5.1). This solution may be stored at 4°C for at least one month. Withdraw 5 ml of this concentrated stock solution and dilute to a final volume of 100 ml. The resulting solution of 50 mg/l is used in the preparation of reference glass (see 8.2).

NOTE – Another reference inhibitor may be used e.g. 3,5 dichlorophenol or phenol

5.5 Stock solution of test substance

Prepare a stock solution or suspension of test substance in water (5.1) at a suitable concentration, e.g. 1 g/l or 10 g/l. It is possible to use waste water without dilution.

6 Apparatus

6.1 Cylindrical glasses with a capacity of approx. 500 ml (e.g. with an internal diameter of approx. 5 cm and a height of approx. 34 cm).

6.2 Pasteur pipettes or other aeration device. The device shall admit an aeration intensity (approx. 600-800 ml air/min) ensuring a homogeneous distribution of the sludge in the test mixture.

6.3 Compressed air supply humidified by passage through a wash bottle containing water.

6.4 Apparatus necessary for analytical determination of ammonia and oxidized nitrogen in solution.

6.5 Filtration apparatus.

6.6 Filter made of glass fibre or paper, which does not release nitrogen.

6.7 pH meter and thermometer for measuring of pH and temperature during the test.

6.8 Oxygen meter for control of the oxygen concentration in the test mixture during the test.

6.9 Equipment: for determination of mixed liquid suspended solids (MLSS). Filtering is made on GF/A glass fibre filters (e.g. Whatman).

7 Sampling of waste water

Sampling shall be conducted in chemically inert, clean containers in accordance with ISO 5667-16. Fill the containers completely and seal them. Test the samples as soon as possible after collection. Where necessary, store the samples at a temperature of 2° to 5 °C in the dark for no longer than 48 h. For longer periods, store at -18°C. Test should preferably be performed within 1 month of sampling. Do not use chemicals to preserve the samples. Perform the necessary pH adjustment just before testing.

8 Procedure

8.1 Use sludges with specific nitrification rates between 1.5 mg of N/(g·h) and 6.5 mg of N/(g·h). If the rate is outside this range, it is essential to modify the procedure (see clause 9).

8.2 The test should be performed in duplicate, i.e. duplicates are prepared of each test concentration, the control and the reference.

High concentration of ammonium/ammonia may inhibit the nitrification. The amount of ammonium/ammonia nitrogen in the test substance is therefore measured and recorded before the testing. If the test substance contains a relatively large amount of ammonium/ammonia nitrogen, the ammonium/ammonia nitrogen concentrations in the test medium dosed to glasses with test substance are adjusted in order to ensure that the concentration in the final test mixture does not exceed 75 mg $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3\text{-N/l}$.

pH of the test substance is measured and recorded. The pH shall be within the interval of 7.6 and 8.0 and is adjusted with hydrochloric/sulphuric acid or a solution of sodium hydroxide if necessary. The amount used of acid/base is recorded.

Water (5.1), medium [usually 25 ml (5.3)] and test substance (5.5) are added to each cylindrical glass in selected volume ratios. The volume of the water is regulated to make up a final total volume of test mixture of 250 ml. The test substance is usually tested in a range of concentrations (often five). The aeration is turned on and it is measured that the oxygen concentration is 6-8 mg O_2/l . The measured O_2 concentrations are recorded.

Include control and reference glasses without test solution. The ATU solution [2.5 ml (5.4) in 250-ml test mixture] is added to the reference glasses so that the final concentration is 0.5 mg/l.

The test is started by adding the necessary amount of washed nitrifying sludge (5.2) to each glass. Use intervals of e.g. 1 minute between addition to successive test glasses. The time of sludge addition is recorded. Add equal volumes of the sludge to the series of glasses so that the final concentration of mixed liquor suspended solids will be

REVISION OF INTERNATIONAL STANDARD

DS/EN ISO 9509: 1989 (E)

approx. 2.0 g MLSS/l (2.0 ± 0.5 g MLSS/l) (see Table A.1). The concentration of ammonium/ammonia nitrogen in the test glasses shall be ≥ 4 mg N/l at the termination of the test.

NOTE: It is allowed to use another sludge concentration when the purpose of the test is to assess the effect on a specific wastewater treatment plant (WWTP) at the actual sludge concentration or if the nitrification rate in the sludge complicates test with the recommended sludge concentration of 2.0 g SS/l. However, it should be noted that the sludge concentration may effect the test results.

8.3 Incubate all glasses for 3 hours at a constant temperature (4) and ordinary room lighting. pH is measured in each test glass within the first 30 minutes and at the termination of the test. The temperature and the pH are measured in each glass simultaneously. Measurements of the temperature may also be performed in selected glasses using thermologgers.

Measure and record the oxygen concentration at least twice during the test period. Keep the oxygen concentration within 6-8 mg O₂/l.

8.4 After 10 to 30, 90 and 180 minutes (the exact sampling time is noted), take a suitable volume of samples, e.g. 5 ml from the controls for analysis of oxidized nitrogen (NO₂⁻ + NO₃⁻ - N). Samples from the remaining glasses are taken after 10 to 30 and 180 minutes. The concentration of ammonium/ammonia nitrogen is analyzed in the samples taken after 180 minutes. A sample from one of the control glasses is analyzed as a minimum.

Filter the samples through a glass fibre filter or a paper filter (6.7). Freeze the samples if analysis is not performed immediately. Thaw out frozen samples at room temperature. It is also possible to thaw out in cold or tepid water. The time of thawing shall be as short as possible and the samples shall be kept cool until the initiation of the analysis. Frozen samples should be analyzed within a week. Thawed samples shall not be re-frozen with the purpose of repeating the analysis. Samples to be analyzed on the day of the test shall be placed in a water bad with ice until initiation of the analysis.

8.5 Take samples (e.g. 20-25 ml) from each glass in the last period of the test (i.e. between 90 and 180 minutes) and determine the concentration of mixed liquor suspended solids in the glasses. Correction in the content of MLSS shall be made if the test substance contains significant amounts of suspended solids. Determine the concentration of MLSS of the test substance and correct the concentration before calculation of the nitrification rate.

8.6 An example of the volume required for setting up the test is shown in Annex A.

9 Calculation and expression of results

9.1 Calculate the nitrification rate by means of linear regression using the analyzed concentration of NO₂⁻ + NO₃⁻ - N. Express the rate in mg NO₂⁻ + NO₃⁻ - N produced per g MLSS (or g SS) per hour.

Calculate the percentage of inhibition of formation of oxidized nitrogen N as follows:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{N_C - N_T}{N_C} \cdot 100$$

where

N_C is the nitrification rate in controls [mg NO₂⁻ + NO₃⁻-N / (g SS · hour)]

N_T is the nitrification rate in glasses with test substance or ATU [mg NO₂⁻ + NO₃⁻-N / (g SS · hour)]

NOTE — Although the measurement of oxidized nitrogen is preferable, the percentage inhibition of ammonium/ammonia removal may be based on NH₄⁺/NH₃-N concentration. However, this disappearance of ammonium/ammonia is not necessarily due to nitrification. Furthermore, ammonium/ammonia may be produced by degradation of nitrogen-containing substances.

9.2 Plot a graph of the percentage inhibition against the log of the concentration of test substance and interpolate the EC50 (and potentially EC20) from this

Alternative, use a linear regression program to estimate the EC50 (and potentially EC20).

10 Validity of results

The production of NO₂⁻ + NO₃⁻ in controls shall be linear in time.

The variations in the temperature measured in the test glasses must be within $\pm 1^\circ\text{C}$ during the whole test period.

The measured pH values must be within the interval of 7.5-9.0 (preferable 7.5-8.5).

The measured oxygen concentrations in the test glasses must be at least 6 mg O₂/l.

The result of the reference (0.5 mg ATU/l) is compared with previous test results and it is assessed whether the result is within the expected interval. If published results from e.g. the performance of a ring test with ATU are available, the achieved inhibitory effect must be within the interval of these results.

It is important that the nitrification has taken place in the control, but it is essential that sufficient ammonium salt (i.e. ≥ 4 mg N/l) is left at the end of the test period to ensure that the substrate was not rate limiting. Nitrification rates between 1.5 mg N/(g SS · h) and 6.5 mg N/(g SS · h) have been found suitable for this procedure for assessment of inhibition. If the rate of nitrification is lower than 1.5 mg N/(g SS · h), use a sludge from another source, or increase the proportion of nitrifiers in the sludge, e.g. by culturing the sludge for a few weeks with synthetic sewage at a suitable retention time (e.g. 6 h) in a laboratory-activated sludge plant [see Reference [4]].

If the nitrification rate is higher than 6.5 mg N/(g SS · h), use either a shorter incubation period or a larger volume of concentrated medium (5.3) to ensure that the concentration of ammonium salt does not become rate-limiting and that the pH does not fall. If necessary, carry out a preliminary test to ascertain the appropriate volume of medium to use.

NOTE — It should be noted, however, that with a larger proportion of nitrifiers, the nitrifier to inhibitor ration will be changed and a different EC50 may result.

REVISION OF INTERNATIONAL STANDARD

DS/EN ISO 9509: 1989 (E)

11 Test report

The test report shall refer to this Standard and the International Standard ISO 9509. The report shall contain the following information:

- a) Identity of the test substance, including sampling, storage time and conditions;
- b) The specific nitrification rate of the activated sludge;
- c) The source, date of sampling, concentration and pre-treatment method of the activated sludge;
- d) Measured data: Temperature, pH, O₂-concentration, MLSS measurements and analytical results of NO₂⁻ + NO₃⁻ - N and NH₄⁺/NH₃-N;
- e) The test results: The nitrification rate and the percentage of inhibition for each test glass are stated together with the concentration of the test substance in the glass. The inhibition curve is plotted and the EC50 (and possibly the EC20) is stated. The 95%-confidence interval of EC50 (and EC20) is given when possible;
- f) The inhibition caused by the reference specific inhibitor;
- g) Any other facts, not specified in this Standard, that are relevant concerning the procedure followed.

Annex A (normative)

Example for preparation of the test

Table A.1

Glass No.	1 + 2	3 + 4	4 + 5	6 + 7	8 + 9	10 +11	12 + 13
Medium (ml)	25	25	25	25	25	25	25
Activated sludge (ml)	125	125	125	125	125	125	125
Reference inhibitor (ml)	0	0	0	0	0	0	2.5
Water (ml)	100	99.75	99.2	97.5	92	75	97.5
Stock solution ¹⁾ of test substance (ml)	0	0.25	0.8	2.5	8.0	25	0
Concentration of test substance (mg/l)	0	1	3.2	10	32	100	0
Total volume (ml)	250	250	250	250	250	250	250
Concentration of activated sludge = 4.0 g MLSS/l							
1) Stock solution: 1 g of test substance per litre.							
NOTE - Undiluted test substance must not be allowed to come into contact with the sludge.							

DHI - Institut for Vand og Miljø - RAPPORTDATABLAD

Dato : 2003.02.10
Sagsnr. : 51202
Division(er) : Miljøkemisk
Afdeling(er) : Økotox
Sagsbehandler(e) : MWN
Sekretær : TKH

TITEL

Nitrifikationshæmning ved brug af ISO 9509 - Del 2
Referencelaboratoriet

Antal sider : 28

Geografisk Område :

Rekvirent : Miljøstyrelsen

Rapporttype A : ☐
B : ☒
D : ☐

I samarbejde med :

Bemærkninger : Diskette