

**Miljøstyrelsens Referencelaboratorium  
Afprøvning af metode til  
nitrifikationshæmning**

**Metodeafprøvning NITRI 2003**



# Miljøstyrelsens Referencelaboratorium

## Afprøvning af metode til nitrifikationshæmning

Strandesplanaden 110  
2665 Vallensbæk Strand

Tlf: 70 22 42 30  
Fax: 70 22 42 55  
E-mail: eurofins@eurofins.dk  
Web: www.eurofins.dk

Februar 2003

|                |                                      |
|----------------|--------------------------------------|
| Klient         | Klientens repræsentant               |
| Miljøstyrelsen | Janne Forslund<br>Lis Morthorst Munk |

|                                                                                         |                 |                                            |              |          |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------|--------------|----------|--------|
| Projekt                                                                                 |                 | Projekt nr.                                |              |          |        |
| Miljøstyrelsens Referencelaboratorium<br>Afprøvning af metode til nitrifikationshæmning |                 | 20089-13                                   |              |          |        |
| Forfatter                                                                               |                 | Dato                                       |              |          |        |
|                                                                                         |                 | Februar 2004                               |              |          |        |
| Margrethe Winther-Nielsen, DHI Institut for Vand og Miljø                               |                 | Godkendt af                                |              |          |        |
|                                                                                         |                 | Ulla O. Lund, Eurofins A/S                 |              |          |        |
|                                                                                         |                 |                                            |              |          |        |
|                                                                                         |                 |                                            |              |          |        |
| x                                                                                       | Endelig Rapport | MWN                                        | UOL          | UOL      | 270204 |
| Revision                                                                                | Beskrivelse     | Udført                                     | Kontrolleret | Godkendt | Dato   |
| Nøgleord                                                                                |                 | Klassifikation                             |              |          |        |
| Spildevand, nitrifikationshæmning,<br>metodeafprøvning, interlaboratorie undersøgelse   |                 | <input checked="" type="checkbox"/> Åben   |              |          |        |
|                                                                                         |                 | <input type="checkbox"/> Intern            |              |          |        |
|                                                                                         |                 | <input type="checkbox"/> Tilhører klienten |              |          |        |

|                         |                |              |
|-------------------------|----------------|--------------|
| Distribution            |                | Antal kopier |
| Deltagende laboratorier |                | 5            |
| Miljøstyrelsen          | Janne Forslund | 10           |
| Eurofins/DHI:           | UOL,MWN        | 2            |

## INDHOLDSFORTEGNELSE

|     |                                                                      |     |
|-----|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | INDLEDNING .....                                                     | 1-1 |
| 2   | BAGGRUND .....                                                       | 2-1 |
| 2.1 | Undersøgelser og vurderinger af DS/EN ISO 9509 .....                 | 2-2 |
| 2.2 | Metodeforskrift for nitrifikationshæmningstest med aktivt slam ..... | 2-3 |
| 3   | TILRETTELÆGGELSE AF METODEAFPRØVNINGEN .....                         | 3-1 |
| 3.1 | Prøver og aktivt slam .....                                          | 3-1 |
| 3.2 | Prøvefremstilling .....                                              | 3-2 |
| 3.3 | Prøvernes homogenitet og stabilitet .....                            | 3-3 |
| 4   | DATABEHANDLING .....                                                 | 4-1 |
| 4.1 | Statistisk bearbejdning .....                                        | 4-1 |
| 4.2 | Fastlæggelse af nominel værdi .....                                  | 4-1 |
| 5   | RESULTATER .....                                                     | 5-1 |
| 5.1 | Korrekthed .....                                                     | 5-3 |
| 5.2 | Præcision .....                                                      | 5-5 |
| 5.3 | Påvisningsgrænse .....                                               | 5-6 |
| 5.4 | Spildevandsprøver i en koncentration på 200 mL/L .....               | 5-7 |
| 6   | KONKLUSIONER OG ANBEFALINGER .....                                   | 6-1 |
| 7   | REFERENCER .....                                                     | 7-1 |
| A   | Metodeforskrift DS/EN ISO 9509 (revideret) .....                     | 1   |
| B   | Deltagere i metodeafprøvning .....                                   | 1   |
| C   | Informationsnotat .....                                              | 1   |
| D   | Symboler og forkortelser .....                                       | 1   |
| E   | Oversigt over alle deltageres resultater – indsendte værdier .....   | 1   |
| F   | Reviderede resultater .....                                          | 1   |
| G   | Generel analysekvalitet og plots .....                               | 1   |
| H   | Deltagernes bemærkninger .....                                       | 1   |
| I   | Endelig metodeforskrift (REFLAB Metode 3:2004) .....                 | 1   |

## **1 INDLEDNING**

Der har igennem en årrække fra flere sider været rejst kritik af den eneste foreliggende standardiserede metode for test af nitrifikationshæmning DS/EN ISO 9509 /1/. Dette har medført af flere laboratorier har udarbejdet deres egen modificerede version af testmetoden med risiko for, at resultatet af en test kan være stærkt afhængig af, hvilket laboratorium, der udfører testen.

Med henblik på at få en fælles testprocedure på danske miljølaboratorier fik Miljøstyrelsens Referencelaboratorium af Referencelaboratoriets styringsgruppe i opdrag at gennemføre en undersøgelse af behovet for specifikation af DS/EN ISO 9509 i 2000. Undersøgelsen blev yderligere suppleret i 2001. Dette førte til udarbejdelse af et tillæg til DS/EN ISO 9509 som blev indarbejdet i den eksisterende standardmetode /2/. Det nye metodeforslag blev gennemgået og diskuteret på en workshop for danske laboratorier, som blev afholdt af Referencelaboratoriet i december 2002. Diskussionerne på workshopen gav anledning til mindre ændringer af metodeforslaget.

For at tilvejebringe data om præcision og sammenlignelighed for metodeforslaget blev der gennemført en metodeafprøvning i efteråret 2003. Resultatet af afprøvningen er præsenteret i denne rapport.

## 2 **BAGGRUND**

I vurderingen af industrielt spildevand, der ledes til et renseanlæg bør indgå undersøgelse af spildevandets effekt på renseanlæggets biologiske processer. Det har tidligere været praksis at benytte en test for slamhæmning efter Dansk Standard (normalt DS 298), men efter udbygning af renseanlæggene til kvælstoffjernelse anbefales det at stille følgende krav til acceptniveauer for et industrispildevands hæmningseffekter på nitrifikationen i aktivt slam ved test med en spildevandskoncentration på 200 mL/L /3/:

- under 20% hæmning opfattes som ubetydeligt (vejledende krav)
- over 50% hæmning er uacceptabelt (grænseværdi).

Test for nitrifikationshæmning på danske laboratorier foretages generelt ved anvendelse af DS/EN ISO 9509 /1/ og en modificeret udgave af MINNTOX (Screeningsmetode /4/). ISO 9509 har været anvendt siden 1989 som den eneste standardiserede metode på området, mens MINNTOX har været anvendt fra begyndelsen af 90'erne /5/. MINNTOX er i princippet en modifikation af DS/EN ISO 9509, som udføres i mindre testvoluminer (10 ml i stedet for 250 ml) og i lukkede testglas.

Som nævnt indledningsvist er der ved anvendelsen af DS/EN ISO 9509 blevet identificeret en række svagheder, som har medført, at laboratorierne har udarbejdet deres egne modificerede versioner af metoden. Blandt hovedkritikpunkterne til DS/EN ISO 9509 er følgende:

- det relative lave krav til iltkoncentration, som kan give hæmning pga. iltbegrænsning
- det manglende krav til en øvre grænse for ammonium/ammoniakkoncentrationen, der kan virke hæmmende i høje koncentrationer.
- manglende angivelse af krav til temperatur og pH-variation under et testforløb
- metoden foreskriver kun enkeltbestemmelser
- der anvendes ikke en referenceinhibitor til vurdering af om effekten på testorganismen (aktiv-slambakterier) ligger på et forventet niveau
- der er intet krav om minimumskoncentration for ammonium/ammoniak eller til dokumentation af, at ammonium/ammoniak ikke har været begrænsende for nitrifikationen under et testforløb
- der er ikke krav om at korrigere for en eventuelt variation i slamkoncentration mellem de enkelte testglas.

Derudover har det vist sig, at opbevaringsforhold og procedure for håndtering af prøver, der udtages af testbeholdere for analyse af nitrit/nitrat kan have afgørende indflydelse på testresultatet. Endelig kan slamkoncentrationen få en indvirkning på resultatet ved test af stoffer eller spildevand med stoffer, der kan sorbere til slampartikler.

De manglende krav og definitioner til ovenstående punkter kan medføre manglende sammenlignelighed af testresultater. De identificerede svagheder er blevet vurderet af Miljøstyrelsens Referencelaboratorium og rapporteret af flere omgange /2, 6/. Der er givet et kort resume af de udførte undersøgelser og vurderingen i det efterfølgende afsnit.

## 2.1 **Undersøgelser og vurderinger af DS/EN ISO 9509**

Testmetoden for nitrifikationshæmning blev modificeret på grundlag af undersøgelser og vurderinger udført af DHIs laboratorier (tidligere VKI), Referencelaboratoriet samt data fra den videnskabelige litteratur. I det følgende opsummeres Referencelaboratoriets konklusioner i relation til de kritiske punkter i testmetoden.

**Iltkoncentrationen:** Minimumskravet til iltkoncentrationen i DS/EN ISO 9509 på 2 mg/L O<sub>2</sub> er tidligere blevet kraftigt kritiseret. Argumentet har været, at nitrifikationen kan være betydeligt hæmmet ved denne lave iltkoncentration. Der har endvidere været publiceret resultater fra undersøgelser i reaktorsystemer med nitrifikation, som indikerer, at iltkoncentrationen i nogle systemer ikke må være mindre end 4 mg/L O<sub>2</sub>, hvis en reduktion af nitrifikationshastigheden skal undgås /7/. Forsøg i Referencelaboratoriet med test af et let omsætteligt og dermed iltforbrugende stof ved en iltkoncentration på henholdsvis ca. 3 og ca. 8 mg/L O<sub>2</sub> bekræftede, at iltkoncentrationen og beluftningsintensiteten kan have afgørende betydning for testresultatet. For at forbedre sammenligningsgrundlaget mellem laboratorier anbefales det at udføre nitrifikationstest i beholdere af ensartede dimensioner, anvende en defineret beluftningsintensitet og belufte til iltmætning, dvs. ca. 6-8 mg/L O<sub>2</sub>.

### **Ammonium/ammoniakkoncentration:**

DS/EN ISO 9509 foreskriver et testmedium, der øger ammonium/ammoniakkoncentrationen med 56 mg/L N i den færdige testblanding. Metoden omtaler ikke risikoen for hæmning forårsaget af ammonium/ammoniak, som Referencelaboratoriet f.eks. har registreret i nitrifikationshæmningstest ved koncentrationer omkring 100 mg/L N /6/. Da det ikke er usædvanligt, at spildevandsprøver indeholder ammonium/ammoniak, er det nødvendigt at kontrollere prøvernes indhold af ammonium/ammoniak før test samt sætte en øvre grænse for ammonium/ammoniakkoncentrationen i en testblanding. En samlet vurdering af flere resultater fra undersøgelser af ammonium/ammoniaks effekt på nitrifikation i aktivt slam resulterede i en anbefaling af 75 mg/L N som øvre grænse for ammonium/ammoniakkoncentrationen i et testglas.

### **Temperaturvariationer:**

Nitrificerende bakterier er følsomme over for ændringer i temperaturen, som kan give en betydelig effekt på nitrifikationshastigheden. I undersøgelser med aktivt slam er en øgning af temperaturen på 10°C i området 10-35°C f.eks. set at resultere i en fordobling af nitrifikationshastigheden /8/. Tidligere undersøgelser udført i Referencelaboratoriet med modificeret MINNTOX /9/ viste endvidere, at nitrifikationshastigheden steg med 15%, når testtemperaturen blev øget fra 20,0° til 22,2°C. På dette grundlag blev det anbefalet, at temperaturen i testglas ikke må variere mere end  $\pm 1^\circ\text{C}$  (eller  $\Delta t \leq 2^\circ\text{C}$ ) i en testserie.

### **pH-variationer:**

Det er generelt fundet, at nitrificerende bakterier har pH-optimum mellem pH 7,5 og 8,0, og at bakterierne kan vokse inden for et pH-interval på ca. 2 pH-enheder /10/. Referencelaboratoriets undersøgelser i 1998 af pHs effekt på nitrifikationen i aktivt slam viste, at nitrifikationshastigheden var stærkt pH-afhængig. De højeste nitrifikationshastigheder blev således målt ved pH mellem ca. 7,5 og 8,5, mens et fald i pH fra f.eks. 7,5 til lidt under 7,0 gav en reduktion i hastigheden svarende til 20%. Erfaringer fra test med

modificeret DS/EN ISO 9509 er, at pH ofte ligger mellem 7,5 og 9,0. Referencelaboratoriet har anbefalet, at pH i testglas ligger i intervallet 7,5-9,0 ved test udført med ISO-metoden.

#### **Replikater:**

Det er kritiseret, at DS/EN ISO 9509 kun foreskriver enkeltbestemmelser. Referencelaboratoriet har i det nye metodeforslag anbefalet brug af dobbeltbestemmelser.

#### **Referenceinhibitor:**

Referencelaboratoriet har gennemført undersøgelser af allylthiourea (ATU) og 3,5-dichlorphenols (3,5-DCP) hæmmende effekt på nitrifikation i aktivt slam med det formål at etablere et grundlag for en fremtidig anvendelse af disse stoffer som referenceinhibitorer i nitrifikationshæmningstest. Undersøgelserne viste, at hæmningseffekten af ATU varierede fra en slamtype til en anden, men at effekten af en specifik ATU-koncentration lå inden for et afgrænset interval. Efterfølgende undersøgelser af ATU har imidlertid vist, at hæmningseffekten af ATU er stærkt afhængig af slamkoncentrationen (koncentrationen af suspenderet stof) i et testglas /11/. Årsagen hertil kan være ATU's evne eller tendens til at sorbere til slampartikler. Det blev derfor vurderet, at 3,5-DCP, der ikke har samme tendens til at sorbere til slampartikler, kunne være mere velegnet som referenceinhibitor.

#### **Slamkoncentration:**

Slamkoncentrationens betydning for resultatet af en hæmningseffekt blev undersøgt ved test med lineær alkylbenzensulfonat (LAS), som kan sorbere til slam. Undersøgelsen viste, at hæmningseffekten af LAS faldt med stigende slamkoncentration i testglas fra 1 til 5 g/L SS /2/. Undersøgelser af zink og ATU, som er beskrevet i litteraturen, viser samme afhængighed af slamkoncentrationen, hvorimod effekten af det ikke sorberbare stof methanol ikke blev påvirket af slamkoncentrationen /11/. Det blev konkluderet, at den anvendte slamkoncentration kan have en betydelig effekt på hæmningseffekten i en test /2/. Referencelaboratoriets anbefalinger er, at test generelt udføres med en slamkoncentration på ca. 2 g /L SS.

#### **Prøver til nitrit/nitrat-analyse:**

Opbevaring og optøningsprocedure for delprøver udtaget fra testblandinger under en nitrifikationshæmningstest er blevet undersøgt og vurderet af Referencelaboratoriet /6/. Undersøgelserne viste, at frosne prøver kan optøs i lunkent vand (25°-30°C), at optøningstiden skal være så kort som muligt, og at de optøede prøver skal opbevares nedkølet indtil udførelse af analysen (i isvand eller ved maks. 5°C). Prøver der har været optøet kan ikke genfryses med henblik på senere analyse. Hvis opbevaringstemperaturen er for høj, kan der ske en bakteriel omsætningen af delprøvens kvælstofforbindelser, hvilket vil resultere i fejlagtige testresultater.

## **2.2    *Metodeforskrift for nitrifikationshæmningstest med aktivt slam***

Den reviderede metode tager udgangspunkt i DS/EN ISO 9509. Afvigelserne fra DS/EN ISO 9509 fremgår af tabel 2.1. De angivne afvigelser er for den version af metodeforslaget (2003.09.30) som blev anvendt ved metodeafprøvningen i oktober 2003. Metodeforslaget er gengivet i Bilag A.

Tabel 2.1 Den reviderede metodeforskrifts afvigelser fra DS/EN ISO 9509

| Punkter i revideret metode (punkter i ISO 9509) | DS/EN ISO 9509 (revideret forslag)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | DS/EN ISO 9509                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1                                             | 3 timers test                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 4 timers test                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 5.4                                             | ATU anvendes i en koncentration på 0,5 mg/L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | ATU anvendes i en koncentration på 11,6 mg/L (hæmmer nitrifikation 100%).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 6.1                                             | Cylindriske glas med f.eks. en diameter på ca. 5 cm og en højde på ca. 34 cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Koniske kolber                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 6.2                                             | Beluftningsintensiteten skal være ca. 600-800 mL luft/min                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 6.4                                             | Udeladt                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Rystebord kan anvendes som alternativ til beluftningsudstyr angivet i pkt. 6.2 og 6.3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 6.7                                             | pH-meter og termometer til målinger under testforløbet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Ingen angivelse                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 6.8                                             | Iltmåler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Ingen angivelse                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 7                                               | Procedure for prøvetagning og opbevaring af prøver forud for test er angivet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Ingen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 8.2 (7.2)                                       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anvendelse af dobbeltbestemmelser</li> <li>2. Øvre grænse for ammonium/ammoniak-koncentrationen i et testglas er 75 mg /L N</li> <li>3. pH-justering af prøve til pH 7,6-8,0</li> <li>4. Iltkoncentrationen skal kontrolleres og være 6-8 mg/L O<sub>2</sub> under hele testforløbet</li> <li>5. Slamkoncentrationen i testglas skal generelt være <math>2,0 \pm 0,5</math> g/L målt som suspenderet stof</li> <li>6. Ammonium/ammoniak-koncentration skal være <math>\geq 4</math> mg N/L N ved testens afslutning</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enkeltbestemmelser anvendes</li> <li>2. Ingen øvre grænse for ammonium/ammoniak-koncentrationen</li> <li>3. Ingen pH-justering</li> <li>4. Iltkoncentrationen skal være over 2 mg/L O<sub>2</sub> (står i pkt. 7.3)</li> <li>5. Slamkoncentrationen skal være ca. 1,5 g/L målt som suspenderet stof</li> <li>6. Ingen angivelse af krav til ammonium/ammoniak-koncentration ved testafslutning</li> </ol> |
| 8.3 (7.3)                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Testglas inkuberes i 3 timer.</li> <li>• Temperatur, pH og iltkoncentration kontrolleres og noteres under testen.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Testglas inkuberes i 4 timer. Iltkoncentrationen skal være over 2 mg/L O <sub>2</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 8.4 (7.4)                                       | Der udtages prøver efter: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10-30, 90 og 180 min i kontrolglas</li> <li>• 10-30 og 180 min i de øvrige testglas.</li> </ul> Procedure for opbevaring af prøver forud for analyse er beskrevet.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Der udtages prøver efter 4 timer fra alle testglas.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 8.5                                             | Der udtages prøver af hvert testglas til bestemmelse af koncentrationen af suspenderet stof                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Intet krav herom                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 9.1 (8.1)                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hæmningseffekten beregnes på basis af en estimeret nitrifikationshastighed i hver enkelt testglas.</li> <li>• Nitrifikationshastigheden bestemmes ud fra de målte nitrit/nitratkoncentrationerne i hvert glas efter 10-30 og 180 minutters test.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                     | Hæmningseffekten beregnes som hovedregel ud fra nitrit/nitrat-koncentrationen i de enkelte glas efter 4 timers test. Koncentrationen i kontrolglas korrigeres forinden for koncentration bestemt i glas med ATU. Hvis den testede prøve eller det anvendte fortyndingsvand indeholder nitrit/nitrat, korrigeres der endvidere herfor.                                                                                                               |



| Punkter i revideret metode (punkter i ISO 9509) | DS/EN ISO 9509 (revideret forslag)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | DS/EN ISO 9509 |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 9.2 (8.2)                                       | EC20 kan eventuelt også estimeres                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | -              |
| 10 (9)                                          | <p>Her er angivet en række yderligere validitetskriterier:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nitrit/nitrat-produktion i kontrolglas skal have været lineær under test-forløbet.</li> <li>• Temperaturvariation må ikke overstige <math>\pm 1^{\circ}\text{C}</math>.</li> <li>• pH skal have været 7,5-9,0</li> <li>• Iltkoncentration skal have været <math>\geq 6</math> mg/L <math>\text{O}_2</math>.</li> <li>• Effekten af referenceinhibitoren skal vurderes i forhold til effekter opnået ved f.eks. præstationsprøvninger.</li> </ul> |                |
| 11 (10)                                         | <p>Der er angivet yderligere krav til test-rapporten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapporten skal indeholde måledata for temperatur, pH, <math>\text{O}_2</math>-koncentration, SS-koncentration, og analyseresultater for nitrit/nitrat- og ammoniumkvælstof.</li> <li>• Testresultaterne skal omfatte nitrifikationshastigheder, hæmningsprocenter (prøve og referenceinhibitor), hæmningskurver og EC50 (evt. EC20).</li> </ul>                                                                                                       |                |

### **3 TILRETTELÆGGELSE AF METODEAFPRØVNINGEN**

Forarbejdet til metodeafprøvningen blev påbegyndt i 2002, hvor danske laboratorier blev inviteret til at deltage i en workshop den 4. december 2002. Formålet med workshoppen var at drøfte forslaget til det nye metodeforslag for nitrifikationshæmningstest og at få identificeret eventuelle uklarheder i proceduren. Der var 16 deltagere på workshoppen, som repræsenterede 10 forskellige laboratorier. Inden workshoppen havde deltagerne fået udsendt metodeforslaget samt et spørgeskema som baggrundsmateriale for drøftelserne på workshoppen.

De laboratorier, der havde deltaget i workshoppen blev tilbudt at deltage i metodeafprøvningen, i en indbydelse, som blev udsendt den 3. juni 2003, med svarfrist den 16. juni 2003. Sammen med indbydelsen blev en oversigt over forsøgsdesign og en kopi af den nye metodeforskrift for nitrifikationshæmningstest sendt ud (Udkast til revideret DS/EN ISO 9509, version rev. 7. februar 2003). Af de indbudte laboratorier gav 5 en positiv tilbagemelding. Sammen med DHI Institut for Vand og Miljø var der altså 6 deltagende laboratorier, alle fra Danmark. En liste over de deltagende laboratorier findes i Bilag B.

Et påmindelsesbrev blev sendt til laboratorierne den 1. oktober 2003. Sammen med brevet blev udsendt et informationsnotat med instrukser og angivelse af prøvemærkning samt test- og resultatskemaer (Bilag C). Desuden blev der udsendt en revideret udgave af metodeforskriften, da Referencelaboratoriet opdagede en mindre trykfejl i metoden. Den udgave, som blev sendt ud sammen med prøverne, er den som findes i Bilag A (rev. 30. september 2003). Prøverne og aktivt slam til brug for første del (se afsnit 3.1) af metodeafprøvningen blev sendt ud til laboratorierne den 7. oktober 2003. Et enkelt af laboratorierne, som ville deltage i begge dele af metodeafprøvningen, havde ikke modtaget to stk. af hver spildevandsprøve den 7. oktober. Der blev derfor foretaget en mindre ændring af proceduren i informationsnotatets punkt 9. Det blev således meddelt samtlige laboratorier, at de skulle dele prøvemængden i én dunk af henholdsvis A og B i to dele. Den ene del skulle bruges i testen den 8. oktober med referenceslammet, og den anden del skulle nedfryses til brug for den efterfølgende test med slam efter eget valg.

Deltagerne indsendte resultater til KPMG, et uafhængigt revisionsfirma, som foretog kodning af resultaterne inden aflevering til Referencelaboratoriet. Afleveringsfrist for resultater til KPMG var den 10. november 2003.

#### **3.1 Prøver og aktivt slam**

Metodeafprøvningen bestod af to dele. Første del af afprøvningen, der fandt sted den 8-9. oktober 2003 på samtlige laboratorier, blev foretaget ved anvendelse af delmængder af én batch aktivt slam (referenceslam) udtaget fra beluftningstanken på Nivå Renseanlæg den 7. oktober 2003. Den anden del af afprøvningen blev udført i perioden 10-31. oktober 2003 med anvendelse af et aktivt slam efter eget valg.

Prøverne, der skulle testes, var de samme i begge dele af metodeafprøvningen. Der blev således anvendt delprøver af spildevand fra en kemisk virksomhed (prøve A), spiket

indløbsvand fra Spildevandscenter Avedøre I/S (prøve B) og det kemiske stof 3,5-dichlorphenol (prøve C).

Formålet med første del af metodeafprøvningen var primært at få en bedømmelse af metodens reproducerbarhed ved test af de samme prøver på forskellige laboratorier med det samme referenceslam. Den anden del af afprøvningen med forskellige slamtyper efter eget valg havde til formål at få en vurdering af slamtypens betydning for testresultatet. Det er tidligere vist, at spildevandsprøvers og kemiske stoffers effekt på nitrifikationen i aktivt slam kan være stærkt afhængig af om slammet er adapteret til det pågældende spildevand eller stof /12/.

### 3.2 **Prøvefremstilling**

Prøverne mærket A og B blev fremstillet ud fra spildevand udtaget den 16. september 2003 fra henholdsvis en kemisk virksomhed og tilløbet til Spildevandscenter Avedøre I/S og leveret til DHI med kurér samme dag. Der blev indleveret ca. 25 liter af hver prøve.

Tidligere undersøgelser af tilsvarende spildevand fra den samme kemiske virksomhed viste stærk hæmning af nitrifikation i aktivt slam. Det samme er ikke konstateret for tilløbsspildevand fra Spildevandscenter Avedøre I/S. For at øge toksiciteten af dette tilløbsvand blev de 25 liter spildevand herfra spiket med 100 mg 3,5-dichlorphenol (3,5-DCP).

Det samlede spildevandsvolumen på ca. 25 liter af hver prøve blev homogeniseret og fordelt på 2,5 liters polyethylendunke under kontinuerlig omrøring. Der blev overført ca. 2 liter prøve til hver dunk. Dunkene blev lukket med skruelåg, frosset og opbevaret ved ca. -20°C indtil forsendelsen den 7. oktober 2003.

Prøven mærket C blev fremstillet ved afvejning af ca. 0,5 g analyserent 3,5-dichlorphenol (Lancaster 2052, 98+%, batch 10051127) i 20 mL glas.

Referenceslammet blev udtaget fra Nivå Renseanlæg den 7. oktober om morgenen og fragtet til DHI. En del af slamvandet blev skilt fra ved en kort sedimentation efterfulgt af dekantering af den ovenstående væske. Slammet blev herefter homogeniseret og fordelt på 2,5 liters polyethylendunke. Slammængden i de enkelte dunke var ca. 25 g SS.

En oversigt over de prøver, der blev udsendt til laboratorierne er givet i table 3.1.

*Tabel 3.1 Prøver af spildevand, kemisk stof og aktivt slam sendt til laboratorierne*

| Prøve                | Beholdere  | Prøvevolumen eller mængde |
|----------------------|------------|---------------------------|
| Spildevand mrk. A    | Plastdunk  | ca. 2 L                   |
| Spildevand mrk. B    | Plastdunk  | ca. 2 L                   |
| 3,5-DCP mrk. C       | Glasflaske | ca. 0,5 g                 |
| Referenceslam (Nivå) | Plastdunk  | ca. 2,5 L                 |

### 3.3 *Prøvernes homogenitet og stabilitet*

Tidligere erfaring viser, at spildevandsprøver som nedfryses og opbevares ved ca. – 20°C ind til test, vil være stabile i flere måneder /4/. Toksiciteten af de to spildevandsprøver A og B forventes derfor ikke at ændres væsentligt som følge af opbevaringsforholdene.

Delprøver af A og B blev undersøgt ved analyse af  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+\text{-N}$ , total-N, total-P og COD for at vurdere om spildevandsprøverne var blevet homogent fordelt på prøvebeholderne à 2,5 L. Analyserne blev udført ved brug af Dr. Langes testkit (LCK 302, LCK 303, LCK 338, LCK 350, LCK 514). Resultaterne viser ingen væsentlige forskelle mellem de analyserede parameter i to tilfældigt udtagne delprøver af A og B (tabel 3.2). Det blev på dette grundlag vurderet, at delprøverne var repræsentative delmængder af de to spildevandsprøver.

*Tabel 3.2 Resultater fra analyse af to delprøver af spildevandsprøve A og B*

| Prøve |     | Analyseret parameter                           |                   |                   |               |
|-------|-----|------------------------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
|       |     | $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+\text{-N}$<br>(mg/L) | total-N<br>(mg/L) | total-P<br>(mg/L) | COD<br>(mg/L) |
| A     | (1) | <1                                             | 175               | <2                | 9250          |
|       | (2) | <1                                             | 162               | <2                | 9350          |
| B     | (1) | 56                                             | 67                | 9,7               | 560           |
|       | (2) | 56                                             | 72                | 10,4              | 601           |

## **4      *DATABASEHANDLING***

### **4.1    *Statistisk bearbejdning***

De deltagende laboratorier er blevet bedt om at udføre testen af hver prøve i fem koncentrationer med dobbeltbestemmelser og at angive testresultatet i form af EC20- og EC50-værdier. Databehandlingen er foretaget i henhold til ISO 5725: "Accuracy (true-ness and precision) of measurement methods and results" /12/. De anvendte symboler og forkortelser er beskrevet i bilag D.

Datamaterialet er for lille til at foretage test af normalfordeling. En visuel inspektion af normalfordelingsplot af residualer giver generelt ikke grund til at tvivle på datamaterialets normalfordelingsegenskaber.

I betragtning af det begrænsede antal deltagere er databehandling foretaget med robust statistik, som er en alternativ metode i henhold til ISO 5725 /13/.

Deltagerne modtog en foreløbig rapport over resultatet af metodeafprøvningen den 10. december 2003.

### **4.2    *Fastlæggelse af nominel værdi***

Hver prøve er tildelt en nominel værdi, som er fastlagt ud fra medianværdierne af deltageres resultater. Dette er Referencelaboratoriets bedste estimat idet den 'sande' hæmningseffekt af en prøve ikke er givet på forhånd.

## 5 RESULTATER

Metodeafprøvningen havde i alt 6 deltagere, Referencelaboratoriet inkluderet. Alle 6 laboratorier havde imidlertid ikke ressourcer til test af alle prøver og nogle måtte standse testen før afslutning p.g.a. opståede problemer under testforløbet. For den enkelte prøve er antallet af deltagere derfor mellem 3 og 5. Resultater fra alle deltagere er vist i bilag E.

Vurdering af rådata tyder på, at laboratorium 1 fejlagtigt har testet prøve C med testkoncentrationer, der var 4 gange højere end angivet i informationsnotatet. Dette medfører, at de oplyste EC-værdier for prøve C fra laboratorium 1 er for lave, og at testresultaterne ikke er valide. Resultaterne fra laboratorium 1's test af prøve C blev derfor ikke medtaget i den endelige statistiske databehandling.

Laboratorium 2 har anvendt hurtigmetoder til analyse af nitrit- og nitratkvælstof. Dette kan have medført en større usikkerhed på bestemmelsen af disse parametre og dermed på det endelige testresultat end ved analyse efter DS 223. De øvrige laboratorier har alle benyttet DS 223. En kontrolberegning ved brug af laboratoriets rådata gav endvidere lidt andre testresultater end angivet i de returnerede resultatskemaer. De reviderede resultater er vedlagt i bilag F.

Laboratorium 3 har ikke korrigeret for spildevandets bidrag til SS-koncentrationen ved beregning af testresultaterne. Den manglende korrektion betyder, at testresultatet er behæftet med en større usikkerhed, end hvis denne korrektion var blevet gennemført. Ud fra laboratoriets datamateriale vurderes det således, at ved test af prøve B i den højeste testkoncentration på 400 mL/L bidrog prøven med op til 20% af den totale SS-koncentration i testglasset.

Laboratorium 4 har ikke fulgt den udsendte metodeforskrift m.h.t. til forbehandling af det aktive slam. Antages det, at der ikke har været en tilledning af nitrifikationshæmmende stoffer til Nivå Renseanlæg i perioden forud for slamafhentningen, skulle denne afvigelse fra metoden dog ikke have haft en væsentlig indvirkning på testresultatet. En kontrolberegning ved brug af laboratoriets rådata gav lidt andre testresultater end angivet i det returnerede resultatskemaer. De reviderede resultater er vedlagt i bilag F.

I den afsluttende databehandling er de korrigerede resultater fra laboratorium 2 og 4 anvendt.

Laboratorium 5 har ikke udført testene efter den udsendte metodeforskrift, og laboratoriets resultater blev derfor ikke medtaget i den endelige statistiske databehandling. En gennemgang af rådata viser, at den anvendte metode bl.a. afviger på følgende punkter:

- testen er overvejende udført med enkeltbestemmelser
- der er ikke udtaget prøver til analyse efter 10-30 minutter, men alene efter 180 minutter
- iltkoncentration, pH og temperatur er kun kontrolleret i 1-2 testglas i en testserie
- slamkoncentrationen er kun målt i kontrolglas, dvs. ikke i hvert enkelt testglas

- de målte slamkoncentrationer viste, at der havde været anvendt op til ca. 5 g SS/L, hvilket er dobbelt så højt som maksimumsgrænsen ifølge metodeforskriften ( $2,0 \pm 0,5$  g SS/L)

Som følge af de ovenfor beskrevne korrektioner i datasættet er de endelige nominelle værdier, som beskrevet i denne rapport, korrigeret i forhold til de, der blev udsendt med den foreløbige rapport til deltagerne. For prøve C testet med eget slam har korrektionerne betydet, at der kun er resultater fra 2 laboratorier til rådighed. I denne prøve er derfor ikke fastlagt en nominel værdi ligesom standardafvigelsen mellem laboratorier ikke er estimeret,

En oversigt over kvalitetsparametre estimeret ud fra de modtagne resultater er vist i tabel 5.1 og 5.2. Data for den generelle analysekvalitet og de enkelte laboratoriers bemærkninger er vedlagt i henholdsvis bilag G og H.

**Tabel 5.1** Generel testkvalitet for nitrifikationshæmningseffekt (EC20 og EC50) bestemt ved anvendelse af aktivt slam fra Nivå Renseanlæg efter DS/EN ISO 9509 (revideret).

| Prøve                              | A    |       | B    |       | C     |       |
|------------------------------------|------|-------|------|-------|-------|-------|
| Endpoint                           | EC20 | EC50  | EC20 | EC50  | EC20  | EC50  |
| p, antal laboratorier              | 4    | 4     | 4    | 4     | 3     | 3     |
| n, antal replikater                | 1    | 1     | 1    | 1     | 1     | 1     |
| $\mu$ , nominel værdi <sup>1</sup> | 57   | 160   | 89   | 280   | 0,35  | 1,3   |
| m, middelværdi <sup>1</sup>        | 61,9 | 160,8 | 89,8 | 276,5 | 0,427 | 1,440 |
| M, median <sup>1</sup>             | 56,9 | 157,0 | 89,0 | 275,5 | 0,350 | 1,300 |
| $S_r^1$                            |      |       |      |       |       |       |
| $S_L^1$                            | 26,5 | 42,9  | 47,3 | 101,2 | 0,180 | 0,482 |
| $S_R^1$                            |      |       |      |       |       |       |
| CV <sub>r</sub> , %                | -    | -     | -    | -     | -     | -     |
| CV <sub>L</sub> , %                | 46,4 | 26,8  | 53,2 | 36,2  | 51,3  | 37,0  |
| CV <sub>R</sub> , %                | -    | -     | -    | -     | -     | -     |

1: mL/L for prøve A og B. mg/L for prøve C

**Tabel 5.2** Generel testkvalitet for nitrifikationshæmningseffekt (EC20 og EC50) bestemt ved anvendelse af aktivt slam fra et selvvalgt renseanlæg efter DS/EN ISO 9509 (revideret).

| Prøve                              | A    |       | B     |       | C     |       |
|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Endpoint                           | EC20 | EC50  | EC20  | EC50  | EC20  | EC50  |
| p, antal laboratorier              | 3    | 3     | 2     | 2     | 2     | 2     |
| n, antal replikater                | 1    | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| $\mu$ , nominel værdi <sup>1</sup> | 48   | 130   | 150   | 400   | -     | -     |
| m, middelværdi <sup>1</sup>        | 48,5 | 142,3 | 152,0 | 435,0 | 0,640 | 2,110 |
| M, median <sup>1</sup>             | 47,5 | 126,0 | 152,0 | 435,0 | 0,640 | 2,110 |
| $S_r^1$                            |      |       |       |       |       |       |
| $S_L^1$                            | 10,2 | 58,0  | -     | -     | -     | -     |
| $S_R^1$                            |      |       |       |       |       |       |
| CV <sub>r</sub> , %                | -    | -     | -     | -     | -     | -     |
| CV <sub>L</sub> , %                | 21,2 | 44,6  | -     | -     | -     | -     |
| CV <sub>R</sub> , %                | -    | -     | -     | -     | -     | -     |

1: mL/L for prøve A og B. mg/L for prøve C

Laboratorium 1, 2, 3 og 6 havde indsendt data for temperatur-, pH- og iltmålinger i samtlige testglas og for hele testperioden. En vurdering af, om metodeforslagets validitetskriterier for disse parametre var opfyldt i de gennemførte test, viste følgende:

- For tre af laboratorierne (1, 2 og 3) var kravet til temperaturvariationen i en serie testglas ( $\Delta t \leq 2^{\circ}\text{C}$ ) ikke opfyldt. Den maksimale temperaturvariation i en testserie var  $4,2^{\circ}\text{C}$ .
- Kriteriet, om at pH skulle være mellem 7,5-9,0, var opfyldt på tre af laboratorierne (1, 3 og 6). På det fjerde laboratorium var der en enkelt pH-måling, der lige akkurat overskred pH 9,0.
- Kriteriet til iltkoncentrationen ( $> 6 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ) var opfyldt i samtlige testglas på alle laboratorier på nær i et testglas, hvor der blev målt en enkelt iltkoncentration på  $5 \text{ mg O}_2/\text{L}$  (laboratorium 6).

Overskridelsen af kravet til temperaturvariationen vurderes at være den afvigelse fra validitetskriterierne, som har haft mest betydning for testresultaterne. En øgning af temperaturen på f.eks.  $10^{\circ}\text{C}$  i området  $10\text{-}35^{\circ}\text{C}$  er tidligere set at give en fordobling af nitrifikationshastigheden /9/. På grundlag af denne viden kan det estimeres, at en temperaturstigning på ca.  $4^{\circ}\text{C}$  vil kunne øge nitrifikationshastigheden med ca. 34%. Temperaturvariationer af denne størrelsesorden vil derfor kunne resultere i en væsentlig usikkerhed på et testresultat. De registrerede forskelle på testresultaterne mellem laboratorier kan derfor godt skyldes, at validitetskriteriet for temperaturen ikke var opfyldt.

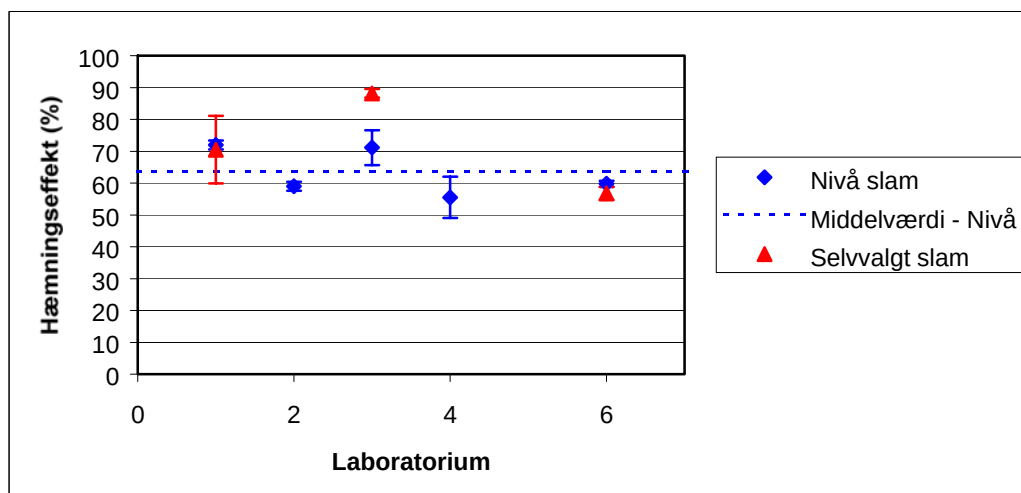
## 5.1 **Korrektthed**

Det giver ikke mening at tale om korrektthed som sådan for en testmetode som nitrifikationshæmning, hvor resultatet er afhængigt af den anvendte procedure og typen af aktivt slam. Imidlertid er det vigtigt at kende hæmningseffekten for referenceinhibitorer med henblik på anvendelse i kvalitetskontrol og præstationsprøvninger.

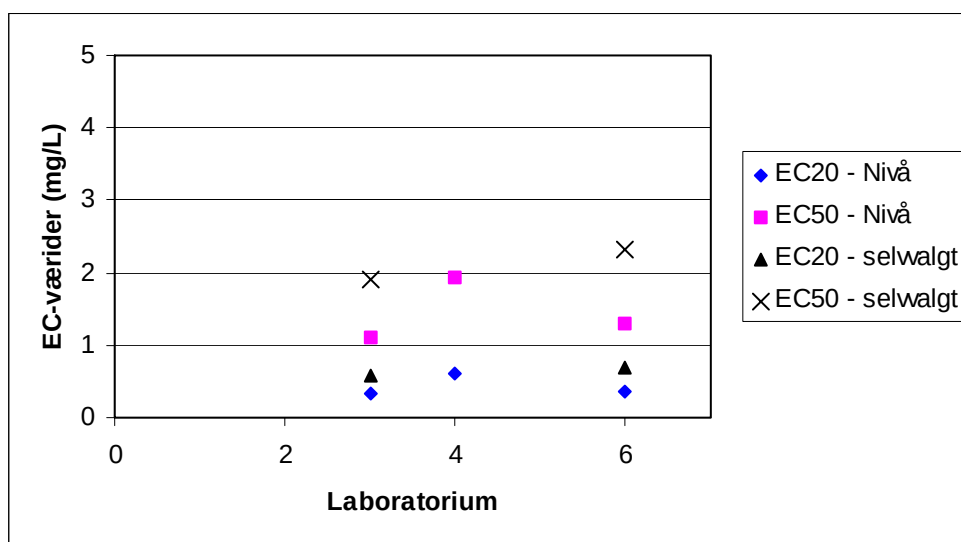
ATU og 3,5-DCP har været overvejet som potentielle referenceinhibitorer. ATU benyttes i DS/EN ISO 9509 i en koncentration, der hæmmer nitrifikationen 100%. Stoffet har endvidere været anvendt som referenceinhibitor i en forsøgsperiode på Referencelaboratoriet i en koncentration, der hæmmer ca. 50%. Der er imidlertid undersøgelser, der tyder på, at effekten af ATU er stærkt afhængig af den anvendte slamkoncentration i et testglas, og at hæmningseffekten af ATU aftager med stigende slamkoncentration /11/. Dette skyldes sandsynligvis en reduktion af den biotilgængelige mængde af ATU ved sorption af ATU til slampartikler. På baggrund af de fysiske-kemiske egenskaber for 3,5-DCP vurderes det, at 3,5-DCP ikke vil sorbere til slampartikler i et væsentligt omfang, og at stoffets hæmningseffekt som følge heraf ikke vil være påvirket af slamkoncentrationen i en test i samme grad som for ATU.

I metodeafprøvningen blev ATU anvendt som referenceinhibitor i en koncentration på  $0,5 \text{ mg/L}$ , mens 3,5-DCP indgik som en særskilt prøve (prøve C), der blev testet i fem koncentrationer. Testresultaterne for de to stoffer er afbildet i figur 5.1 og 5.2.





Figur 5.1 Laboratoriernes resultater fra test af ATU i en koncentration på 0,5 mg/L



Figur 5.2 Laboratoriernes resultater fra test af 3,5 DCP

Test af ATU med slam fra Nivå på 5 laboratorier resulterede i hæmningseffekter på 56-72% (middelværdier af replikater), mens den tilsvarende test udført på 3 af laboratorierne med et selvvalgt aktivt slam viste middelværdier for hæmningseffekten på 57-88%. Variationskoefficienten på replikater lå i begge testserier mellem 1,5 og 15%. Det er Referencelaboratoriets erfaring, at variationskoefficienter på replikater generelt er  $\leq 5\%$  ved anvendelse af den reviderede testmetode. For hovedparten af de deltagende laboratorier er de fundne variationskoefficienter derfor en hel del større end forventet. Middelværdien (m) og standardafvigelsen (s) for samtlige testresultater med ATU i en koncentration på 0,5 mg/L er fundet at være ( $m \pm s$ ):

$$\text{Hæmningseffekt (0,5 mg ATU/L)} = 66 \pm 12\%$$

Der er kun anvendelige testresultater med 3,5-DCP fra 2-3 laboratorier. Datagrundlaget for vurdering af toksicitetsniveauet for 3,5-DCP med henblik på fastlæggelse af et validitetskriterium er derfor beskedent. Et foreløbigt validitetskriterium for testmetoden er fremkommet ved beregning af middelværdien og standardafvigelsen på EC50-værdien for samtlige fem testresultater med 3,5-DCP:

$$EC50 = 1,7 \pm 0,5 \text{ mg/L}$$

Et ofte anvendt validitetskriterium i økotoksikologiske test er, at EC50-værdien opnået ved test med en referenceinhibitor skal ligge inden for intervallet  $m \pm 2s$ . I det aktuelle tilfælde betyder det, at ved test med 3,5-DCP skal laboratoriet opnå en EC50-værdi i intervallet 0,7-2,7 mg/L, for at testen skal kunne betragtes som valid. På grund af det spinkle datagrundlag er det imidlertid ikke rimeligt at fastlægge et validitetskriterium for test af 3,5-DCP. Det anbefales derfor, at bruge ovenstående kriterium som vejledende, indtil der foreligger et større datagrundlag.

Det skal fremhæves, at variationen på det opnåede testresultat for 3,5-DCP med nitrifikationshæmningstesten ikke er væsentligt forskellig fra variationer fundet ved tilsvarende metodeafprøvninger af andre toksicitetstest. F.eks. viste en ringtest af ISO 10253 på 7-10 forskellige laboratorier med algerne *Skeletonema costatum* og *Phaeodactylum tri-cornutum* EC50-værdier på henholdsvis  $1,6 \pm 0,3 \text{ mg/L}$  og  $2,7 \pm 0,2 \text{ mg/L}$  ved test med 3,5-DCP /14/.

Introduktion af en referenceinhibitor, som testes i fem koncentrationer, vil medføre en relativt stor forøgelse af testomkostningerne. For at undgå dette kan det vælges at teste referenceinhibitoren i en enkelt koncentration på 2 mg/L. Analyse af testresultaterne fra laboratorierne efter samme princip som ved fastlæggelse af et validitetskriterium for EC50-værdien gav følgende resultat ( $m \pm s$ ):

$$\text{Hæmningseffekt (2 mg 3,5-DCP/L)} = 55 \pm 8\%$$

På dette grundlag er et foreløbigt validitetskriterium for test af 3,5-DCP i en koncentration på 2 mg/L fastsat til 39-71% hæmning.

Vurderingen af resultaterne fra test af de to potentielle referencestoffer ATU og 3,5-DCP i en koncentration på henholdsvis 0,5 mg/L og 2 mg/L viser, at der ikke er væsentligt forskel på de beregnede standardafvigelser. På det foreliggende datagrundlag er det derfor ikke muligt at konkludere, at 3,5-DCP er mere velegnet som referenceinhibitor end ATU. De data, der er anvendt i vurderingen er imidlertid fremkommet ved test, hvor slamkoncentrationen lå i et forholdsvis snævert interval omkring 2 g SS/L. Som nævnt ovenfor er der andre undersøgelser, der tyder på, at hæmningseffekten af ATU er stærkt afhængig af slamkoncentrationen i en nitrifikationshæmningstest. Det anbefales derfor at benytte en referenceinhibitor som f.eks. 3,5-DCP, hvor der ikke forventes samme afhængighed af slamkoncentrationen.

## 5.2 **Præcision**

Præcisionen angiver, i hvilken grad der er overensstemmelse mellem gentagne målinger på samme prøve under gennemførelse af hele testmetoden for hver delprøve /15/. Delta-gerne har kun foretaget én test for hver kombination af prøve og slam, og det er derfor ikke muligt at estimere repeterbarheden og dermed heller ikke reproducerbarheden /13/.

Det er imidlertid muligt at estimere standardafvigelsen mellem laboratorier, som sammen med repeterbarheden bestemmer reproducerbarheden. Standardafvigelsen mellem

laboratorier må antages at give det største bidrag til reproducerbarheden. Standardafvigelsen er bestemt med stor usikkerhed som følge af det begrænsede datamateriale. Standardafvigelsen mellem laboratorier er vist i tabel 5.3.

*Tabel 5.3 Standardafvigelse mellem laboratorier ved bestemmelse af nitrifikationshæmningseffekt efter DS/EN 9509 (revideret).*

| Prøve                | A               |   |                 |   | B               |   |                 |   | C               |   |                 |   |
|----------------------|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|
| Endpoint             | EC20            |   | EC50            |   | EC20            |   | EC50            |   | EC20            |   | EC50            |   |
|                      | CV <sub>L</sub> | p | CV <sub>L</sub> | p | CV <sub>L</sub> | p | CV <sub>L</sub> | p | CV <sub>L</sub> | p | CV <sub>L</sub> | p |
| Aktivt slam:         | %               |   | %               |   | %               |   | %               |   | %               |   | %               |   |
| Nivå Renseanlæg      | 46              | 4 | 27              | 4 | 53              | 4 | 36              | 4 | 51              | 3 | 37              | 3 |
| Selvvalgt renseanlæg | 21              | 3 | 45              | 3 |                 | 2 |                 | 2 |                 | 2 |                 | 2 |

CV<sub>L</sub>: variationskoefficient mellem laboratorier

p: antal laboratorier, hvis data indgår i beregning af CV<sub>L</sub>

Variationskoefficienten mellem laboratorier for test med slam fra Nivå Renseanlæg varierer mellem 27 og 37% for EC50 og mellem 46 og 53% for EC20. I prøve A, som er den eneste prøve for hvilken variationskoefficienten er estimeret med anvendelse af slam fra selvvalgt renseanlæg, er variationskoefficienten af samme størrelsesorden som for test med slam fra Nivå Renseanlæg.

### 5.3 Påvisningsgrænse

For at kunne beskrive, hvornår en reduktion af nitrifikationshastigheden i aktivt slam tilsat prøve (spildevand/kemikalium) kan tilskrives en hæmningseffekt og ikke en spredning på testresultater, blev der foretaget en estimering af metodens påvisningsgrænse (CD) /15/. CD blev defineret som den reduktion i nitrifikationshastigheden, der lige netop ville give signifikans på 5%-niveau, og blev estimeret ved anvendelse af et 'poolet' estimat  $s_k$  for standardafvigelsen på nitrifikationshastigheden i replikater af kontrolglas uden prøve:

$$CD = t_{0,95}(f) s_k (1 + 1/n)^{1/2}$$

hvor

$t_{0,95}$  er 95%-fraktilen i t-fordelingen

$f$  er antallet af frihedsgrader ved bestemmelse af  $s_k$

$n$  er antallet af replikater for kontroller i en testserie

$s_k$  er beregnet som et "poolet" estimat for standardafvigelsen på nitrifikationshastigheden i replikater af kontrolglas.

Påvisningsgrænsen blev estimeret på basis af de nitrifikationshastigheder, der blev bestemt i kontrolglas ved test med slammet fra Nivå Renseanlæg på den første forsøgsdag (8.10.2003). Der blev anvendt resultater fra laboratorium 1, 2, 3, 4 og 6. Påvisningsgrænsen blev på dette grundlag bestemt til 0,25 mg N/g SS/t. Med en middelværdi på nitrifikationshastigheden i kontrolglas på 3,04 mg N/g SS/t betyder det, at den mindste signifikante hæmningseffekt, der ville kunne detekteres med testmetoden i de gennemførte test med Nivå slam, var 8%.

## 5.4 Spildevandsprøver i en koncentration på 200 mL/L

Vejledning fra Miljøstyrelsen Nr. 11 anbefaler, at der stilles krav til resultatet af en nitrifikationshæmningstest, hvor der er anvendt en testkoncentration af spildevand på 200 mL/L /3/. Prøve A og B blev begge testet i en koncentration på 200 mL/L. Resultaterne herfra kan give et indtryk af variationen på den testparameter, der anvendes til vurdering af, om en industrivirksomhed udleder nitrifikationshæmmende stoffer i et uacceptabelt omfang.

Resultaterne fra test af prøve A og B i en koncentration på 200 mL/L med slam fra Nivå Renseanlæg er vist i tabel 5.4. Tabellen indeholder samtlige testresultater, dvs. også resultaterne fra de laboratorier, der afveg fra metodeforskriften.

Tabel 5.4 Prøve A's og B's effekt på nitrifikationen i aktivt slam fra Nivå Renseanlæg ved test i en koncentration på 200 mL/L

| Laboratorium   | Prøve A            |          | Prøve B            |          |
|----------------|--------------------|----------|--------------------|----------|
|                | Hæmningseffekt (%) |          | Hæmningseffekt (%) |          |
|                | Middelværdi        | St. afv. | Middelværdi        | St. afv. |
| 1 <sup>1</sup> |                    |          |                    |          |
| 2 <sup>2</sup> | 48,1               | 7,8      | 45,8               | 8,1      |
| 3 <sup>3</sup> | 67,9               | 0,7      | 55,7               | 0,7      |
| 4 <sup>4</sup> | 56,9               | 0,5      | 39,0               | 0,8      |
| 5 <sup>5</sup> | (75,4)             | (1,6)    | (25,7)             | (0,0)    |
| 6              | 64,5               | 2,1      | 34,2               | 1,3      |

1: ingen testresultater

2: anvendte hurtigmetoder til nitrit- og nitratanalyse

3: afveg fra metodeforskriften, dvs. ingen korrektion for SS-bidrag fra prøve

4: afveg i mindre grad fra metodeforskriften, dvs. ingen vask af slam før test

5: afveg væsentligt fra metodeforskriften og resultatet er derfor udeladt i vurderingen

Ved test af prøve A og B er differencen på den laveste og højeste hæmningseffekt på 20-22%. Anvendes de to grænseværdier på 20% og 50% hæmning for henholdsvis 'ubetydelig hæmning' og 'uacceptabel hæmning' på ovenstående resultater, vil hæmningseffekten for prøve A blive kategoriseret som uacceptabel efter test på tre ud af fire laboratorier. På det fjerde laboratorium (2) vil prøve A blive vurderet som værende stærkt hæmmende, men effekten vil være lige akkurat under grænsen for en uacceptabel hæmning. Trods de fundne forskelle i testresultaterne fra de fire laboratorier vil prøve A altså blive kategoriseret nogenlunde ensartet.

Ved test af prøve B fandt laboratorium 2, 4 og 6 hæmningseffekter på henholdsvis 46, 39 og 34%, hvilket medfører, at prøvens hæmningseffekt vil blive kategoriseret som betydelig, men ikke uacceptabel. Laboratorium 3 fandt hæmningseffekter på  $\geq 50\%$ , som medfører, at prøven vurderes som værende uacceptabelt hæmmende. En undersøgelse på laboratorium 3 ville således føre til den konklusion, at der burde iværksættes undersøgelser af årsagen til hæmningseffekten jf. vejledningen fra Miljøstyrelsen /3/.

## 6 KONKLUSIONER OG ANBEFALINGER

Metodeafprøvningen viser, at de laboratorier der deltog i afprøvningen, havde vanskeligheder med at overholde validitetskriteriet for temperaturvariationen. Dette kan have stor betydning for det endelige testresultat og kan være en del af årsagen til de observerede variationer på testresultaterne mellem laboratorier. Kravet til temperaturvariationen ville kunne opfyldes ved gennemførelse af testen i et termostateret rum.

Halvdelen af de 6 laboratorier der deltog i afprøvningen fulgte ikke metodeforskriften fuldstændigt. To af laboratorierne fraveg forskriften på et enkelt punkt, mens et tredje laboratorium fraveg forskriften på flere væsentlige punkter. Resultaterne fra dette laboratorium indgik ikke i databehandlingen af testresultaterne.

Metodeafprøvningen viser kvalitetsparametre for metoden som anført nedenfor.

**Korrektthed** bestemt som effekten af referenceinhibitorerne ATU og 3,5-DCP. Test af ATU i en koncentration på 0,5 mg/L med aktivt slam fra forskellige renseanlæg gav hæmningseffekter på mellem 56 og 88%. Middelværdien for test af 0,5 mg ATU per L blev fundet at være  $66 \pm 12\%$ . Test af 3,5-DCP i fem koncentrationer viste en middelværdi for EC50 på  $1,71 \pm 0,50$  mg/L, mens middelværdien for test af 2 mg 3,5-DCP per L blev fundet at være  $55 \pm 8\%$ .

**Afvigelsen mellem laboratorier** udtrykt som variationskoefficienten  $CV_L$  ved test af spildevandsprøver varierede mellem 27 og 53% for test udført med samme slamtype og mellem 21 og 45% for test med forskellige slamtyper. Resultaterne fra test af spildevandsprøverne i koncentrationer på 200 mL/L viste differencer mellem hæmningseffekter (udtrykt i procent) på op til 22%.

**Påvisningsgrænsen** estimeret på basis af nitrifikationshastigheder i kontrolglas med samme slamtype viste, at en ændring i nitrifikationshastigheden på 0,25 mg N/g SS/t var statistisk signifikant på 5%-niveau. En reduktion i nitrifikationshastigheden af denne størrelse kan således tilskrives en effekt af den testede prøve.

Påvisningsgrænsen er her defineret som

$$DL = t_{0,95}(f) s_k (1 + 1/n)^{1/2}$$

hvor  $t_{0,95}$  er 95%-fraktilen i t-fordelingen,  $f$  er antallet af frihedsgrader ved bestemmelse af  $s_k$ ,  $s_k$  er beregnet som et 'poolet' estimat for standardafvigelsen på nitrifikationshastigheden i replikater af kontrolglas og  $n$  er antallet af replikater for kontroller i en testserie.

Det statistiske grundlag for bestemmelse af metodens kvalitetsparametre er ikke tilfredsstillende som følge af at adskillige data måtte udelukkes fra databehandling. Det anbefales alligevel at udgive metoden, der er anført i bilag I, som metode fra Reference-laboratoriet, da de opnåede kvalitetsdata viser en kvalitet, der er så god, som det kan forventes. Det anbefales desuden at søge den modificerede metode udbredt internationalt og derigennem at skaffe sikre data for metodens validitet.

Afvigelsen mellem laboratorier ved test af de samme spildevandsprøver og anvendelse af slam fra samme batch er forholdsvis stor. De fundne variationer er dog ikke væsentligt større end det, der er fundet ved afprøvning af andre økotoksikologiske test. Det anbefales, at gøre laboratorierne opmærksomme på temperaturvariationens betydning og at opsamle yderligere data fra test af referenceinhibitoren 3,5-DCP i kommende præstationsprøvninger. Såfremt disse data giver grundlag herfor, revideres det angivne validitetskriterium for referenceinhibitoren.

Korrekt opbevaring og forberedelse af prøver til nitrit/nitrat-analyse med kvælstofomsættende mikroorganismer er essentiel for resultatet af en nitrifikationshæmningstest. Det er nødvendigt at laboratorierne er meget omhyggelige under optøning af prøver, således at der ikke sker omsætning under forberedelse til analyse. Det anbefales derfor, at der gennemføres præstationsprøvning for nitrit/nitratanalyse, hvor der anvendes spikede prøver med et indhold af kvælstofomsættende mikroorganismer.

## 7      **REFERENCER**

- /1/    DS/EN ISO 9509 (1996): Vandundersøgelse. Nitrifikationshæmning for kemikalier og spildevand. Bestemmelse med aktiveret slam.
- /2/    Winther-Nielsen, M og C. Seierø (2003). Nitrifikationshæmningstest ved brug af ISO 9509. Del 2. Referencelaboratoriet. Rapport til Miljøstyrelsen. DHI – Institut for Vand og Miljø. Februar 2003.
- /3/    Vejledning fra Miljøstyrelsen Nr. 11 (2002): Tilslutning af industrispildevand til offentlig spildevandsanlæg. Miljøstyrelsen, Miljøministeriet.
- /4/    Naturvårdsverket (1995): Screeningsmetod för bestämning av nitrifikationshämning vid drift av kommunala avloppsreningsverk. SKARV-projektet. Naturvårdsverkets rapport 4424. April 1995.
- /5/    Arvin, E, S. Dyreborg, C. Menck & J. Olsen (1994): A mini-nitrification test for toxicity screening, *MINNTOX*. *Water Res.* 28(9):2929-2931.
- /6/    Winther-Nielsen, M, K. Stuckert og C. Seierø (2003). Nitrifikationshæmningstest ved brug af ISO 9509. Del 1. Referencelaboratoriet. Rapport til Miljøstyrelsen. DHI – Institut for Vand og Miljø. Februar 2003.
- /7/    Vandkvalitetsinstituttet, ATV og Laboratoriet for Teknisk Hygiejne, DTH (1991): Simuleringssystem til styring af renseanlæg. Intern projektrapport, oktober 1991. Teknologirådsprojekt.
- /8/    Painter, H.A. (1986): Nitrification in the treatment of sewage and wastewaters. In *Nitrification* (Ed. Prosser, J.I.); Society for General Microbiology, Vol. 20, Washington D.C. pp. 185-211.
- /9/    Mikrobielle slamhæmningstests. NYT fra REFLAB 1998/2. Miljøstyrelsens Referencelaboratorium for kemiske miljøanalyser.
- /10/   Prosser, J.I. (1989): Authrophic Nitrification in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 30:126-181.
- /11/   Jönsson, K. (2001): Inhibition of Nitrification in Municipal Wastewater – Sources, Effects, Evaluation and Remedies. PhD thesis, Lund University 2001. 159 pages.
- /12/   Winther-Nielsen, M. og J. C. Jansen (1992): Screening af industrispildevand for nitrifikationshæmning. Arbejdsrapport vedrørende SKARV-projekt – nitrifikationshæmning. VKI. December 1992.
- /13/   DS/ISO 5725-2 (1995): Nøjagtighed (korrekthed og præcision) af målemetoder og resultater – *Del 2: Grundlæggende metode til bestemmelse af repeterbarhed og reproducerbarhed for en standardiseret målemetode*.
- /14/   ISO 10253 (1995): Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.
- /15/   Lund, U., K. Andersen og P.S. Sørensen (1994): Håndbog i metodevalidering for miljølaboratorier. Miljøstyrelsens referencelaboratorium, VKI.

***B I L A G***



## ***B I L A G   A***

***Metodeforskrift DS/EN ISO 9509 (revideret)***

# **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.

### 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 (5.1) 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 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 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.

## REVISION OF INTERNATIONAL STANDARD

## DS/EN ISO 9509: 1989 (E)

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  $\text{O}_2/\text{l}$ . The measured  $\text{O}_2$  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 approx. 2.0 g MLSS/l ( $2.0 \pm 0.5$  g MLSS/l) (see Table A.1). The concentration of ammonium/ammonia nitrogen in the test glasses shall be  $\geq 4$  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  $\text{O}_2/\text{l}$ .

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 ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- - \text{N}$ ). 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  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- - \text{N}$ . Express the rate in mg  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- - \text{N}$  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

## REVISION OF INTERNATIONAL STANDARD

## DS/EN ISO 9509: 1989 (E)

$N_C$  is the nitrification rate in controls [ $\text{mg NO}_2^- + \text{NO}_3^- \cdot \text{N} / (\text{g SS} \cdot \text{hour})$ ]

$N_T$  is the nitrification rate in glasses with test substance or ATU [ $\text{mg NO}_2^- + \text{NO}_3^- \cdot \text{N} / (\text{g SS} \cdot \text{hour})$ ]

NOTE – Although the measurement of oxidized nitrogen is preferable, the percentage inhibition of ammonium/ammonia removal may be based on  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3\text{-N}$  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  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  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  $\text{O}_2/\text{l}$ .

**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.  $\geq 4 \text{ mg N/l}$ ) 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.

## 11 Test report

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

- Identity of the test substance, including sampling, storage time and conditions;
- The specific nitrification rate of the activated sludge;
- The source, date of sampling, concentration and pre-treatment method of the activated sludge;
- Measured data: Temperature, pH,  $\text{O}_2$ -concentration, MLSS measurements and analytical results of  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- \cdot \text{N}$  and  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3\text{-N}$ ;
- 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;
- The inhibition caused by the reference specific inhibitor;
- 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**

| <b>Glass No.</b>                                    | <b>1 + 2</b> | <b>3 + 4</b> | <b>4 + 5</b> | <b>6 + 7</b> | <b>8 + 9</b> | <b>10 +11</b> | <b>12 + 13</b> |
|-----------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| 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 <sup>1)</sup> 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.

## ***B I L A G   B***

### ***Deltagere i metodeafprøvning***



| <b>Deltagere i metodeafprøvningen</b> |
|---------------------------------------|
| Analytech Miljølaboratorium ApS       |
| DHI – Institut for Vand og Miljø      |
| Eurofins Danmark A/S, Viborg          |
| Miljøcenter Vestjylland I/S           |
| ROVESTA Miljø I/S                     |
| Spildevandscenter Avedøre I/S         |

**B I L A G C**

***Informationsnotat***

## ***B I L A G   D***

### ***Symboler og forkortelser***

## Tabeller

### Laboratoriets resultat i præstationsprøvningen

|                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <                                        | "Mindre end" er ikke medtaget i beregningerne                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Afvigelse fra nominel værdi, semigrafisk | Her er anført det antal standardafvigelser, som det pågældende laboratoriums resultater afviger fra den nominelle værdi (enten "mindre end 1", "mellem 1 og 2", eller "større end 2"). Et "+" betyder her, at resultatet er højere end den nominelle værdi og et "-", at resultatet er mindre end den nominelle værdi. Denne rapporteringsmåde giver mulighed for en hurtig evaluering af laboratoriets præstation, idet det forventes, at kun fem af hver hundrede resultater afviger fra den nominelle værdi med mere end to standardafvigelser. |
| Grubbs outlier                           | For stor afvigelse i forhold til gennemsnitsværdien, beregnet i henhold til ISO 5725-2 /1/. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske behandling.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Cochran outlier                          | For stor forskel indenfor prøveparret, beregnet i henhold til ISO 5725-2 /1/. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske behandling.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| $s_i$                                    | Det enkelte laboratoriums standardafvigelse, svarende til variationen mellem resultater ved gentagne bestemmelser af en prøve.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

### Oversigt over alle deltageres resultater

|     |                                                                                                                                                                            |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <   | "Mindre end" er ikke medtaget i beregningerne                                                                                                                              |
| C** | Cochran outlier. For stor forskel indenfor prøveparret, beregnet i henhold til ISO 5725-2 /1/. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske databehandling              |
| G** | Grubbs outlier. For stor afvigelse i forhold til gennemsnitsværdien, beregnet i henhold til ISO 5725-2 /1/. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske databehandling |
| **  | Andre laboratorier, der udelukkes efter faglig vurdering. Resultaterne er ikke medtaget i den statistiske databehandling                                                   |

### Generel analysekvalitet

|                          |                                                                                                                                                      |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antal inkl. laboratorier | Antal rapporterede resultater minus eventuelle udelukkelse efter faglig vurdering (**), minus Cochran outliers (C**) og minus Grubbs outliers (G**). |
| $\mu$                    | Nominel værdi (= "sand" værdi)                                                                                                                       |
| m                        | Middelværdi, beregnet som gennemsnit af alle ikke-udelukkede resultater for hver prøve.                                                              |
| M                        | Median. Halvdelen af resultaterne har en højere værdi, og halvdelen af resultaterne har en lavere værdi end medianen.                                |
| $s_r$                    | Standardafvigelse inden for ét laboratorium                                                                                                          |
| $s_L$                    | Standardafvigelse mellem laboratorierne                                                                                                              |
| $s_R$                    | Standardafvigelse på reproducerbarheden: $s_R = \sqrt{(s_r^2 + s_L^2)}$                                                                              |
| $CV_r$                   | Variationskoefficient inden for ét laboratorium; $(s_r \cdot 100)/\mu$                                                                               |
| $CV_R$                   | Total variationskoefficient; $(s_R \cdot 100)/\mu$                                                                                                   |

## Liniediagrammer

|    |                                                      |
|----|------------------------------------------------------|
| ** | Manuelt udelukkede resultater, ikke medtaget i plots |
|----|------------------------------------------------------|

Alle resultater for et laboratorium er vist med lodrette linier ud for det pågældende laboratoriums kodenummer. Resultaterne er forbundet med en vandret streg.

I hvert plot er der indtegnet en lodret linie svarende til den nominelle værdi.

Resultater, der ligger tæt ved den nominelle værdi, er med god analysekvalitet. Et mål for størrelsen af standardafvigelsen på gentagen bestemmelse af en prøve ses af længden af den vandrette streg, der forbinder et enkelt laboratoriums resultater. En kort linie svarer til en lille standardafvigelse, mens en lang linie viser en større standardafvigelse.

Resultater, som er udelukket ved Cochran's test eller ved Grubbs' test, er i selve plottet markeret med en ring omkring laboratorienummeret og med angivelse af outliertype.

/1/ DS/ISO 5725-2: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, 1994.

## ***B I L A G   E***

***Oversigt over alle deltageres resultater – indsendte værdier***

| Laboratorium | EC <sub>20</sub> Nivå slam, mL/L |   |        | EC <sub>20</sub> Nivå slam, mL/L |   |        | EC <sub>20</sub> Nivå slam, mL/L |   |        |
|--------------|----------------------------------|---|--------|----------------------------------|---|--------|----------------------------------|---|--------|
|              | A                                |   | Metode | B                                |   | Metode | C                                |   | Metode |
|              | Nominel værdi                    |   |        | Nominel værdi                    |   |        | Nominel værdi                    |   |        |
|              | 63                               |   |        | 120                              |   |        | 0.32                             |   |        |
| 1            | -                                | - | 1      | -                                | - | 1      | 0.11                             | - | 1      |
| 2            | 82.82                            | - |        | 100.81                           | - |        | -                                | - |        |
| 3            | 50                               | - |        | 60                               | - |        | 0.32                             | - |        |
| 4            | 63                               | - |        | 175                              | - |        | 0.30                             | - |        |
| 5            | 43.7                             | - |        | 158                              | - |        | 0.44                             | - |        |
| 6            | 63.7                             | - |        | 118                              | - |        | 0.35                             | - |        |

| Laboratorium | EC <sub>50</sub> Nivå slam, mL/L |        | EC <sub>50</sub> Nivå slam, mL/L |        | EC <sub>50</sub> Nivå slam, mL/L |        |
|--------------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
|              | A                                | Metode | B                                | Metode | C                                | Metode |
|              | Nominel værdi                    |        | Nominel værdi                    |        | Nominel værdi                    |        |
|              | 140                              |        | 330                              |        | 1.3                              |        |
| 1            | -                                | -      | -                                | -      | 0.257                            | -      |
| 2            | 207.04                           | -      | 252.02                           | -      | -                                | -      |
| 3            | 121                              | -      | 176                              | -      | 1.1                              | -      |
| 4            | 172                              | -      | 450                              | -      | 1.50                             | -      |
| 5            | 79.4                             | -      | 331                              | -      | 1.45                             | -      |
| 6            | 141                              | -      | 379                              | -      | 1.30                             | -      |

| Laboratorium | EC <sub>20</sub> eget slam, mL/L |        | EC <sub>20</sub> eget slam, mL/L |        | EC <sub>20</sub> eget slam, mL/L |        |
|--------------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
|              | A                                | Metode | B                                | Metode | C                                | Metode |
|              | Nominel værdi                    |        | Nominel værdi                    |        | Nominel værdi                    |        |
|              | 52                               |        | 160                              |        | 0.69                             |        |
| 1            | 58                               | -      | -                                | -      | -                                | -      |
| 2            | -                                | -      | -                                | -      | -                                | -      |
| 3            | 40                               | -      | 143                              | -      | 0.59                             | -      |
| 4            | -                                | -      | -                                | -      | -                                | -      |
| 5            | 56.2                             | -      | 200                              | -      | 1.05                             | -      |
| 6            | 47.5                             | -      | 161                              | -      | 0.69                             | -      |

| Laboratorium | EC <sub>50</sub> eget slam, mL/L |        | EC <sub>50</sub> eget slam, mL/L |        | EC <sub>50</sub> eget slam, mL/L |        |
|--------------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
|              | A                                | Metode | B                                | Metode | C                                | Metode |
|              | Nominel værdi                    |        | Nominel værdi                    |        | Nominel værdi                    |        |
|              | 130                              |        | 400                              |        | 2.3                              |        |
| 1            | 200                              | -      | -                                | -      | -                                | -      |
| 2            | -                                | -      | -                                | -      | -                                | -      |
| 3            | 101                              | -      | 470                              | -      | 1.9                              | -      |
| 4            | -                                | -      | -                                | -      | -                                | -      |
| 5            | 129                              | -      | 400                              | -      | 3.16                             | -      |
| 6            | 126                              | -      | 400                              | -      | 2.32                             | -      |

**B I L A G F**

***Reviderede resultater***



*Tabel F.1 Indsendte og reviderede testresultater for laboratorium 2. EC-værdierne er angivet i mL/L for prøve A og B samt i mg/L for prøve C*

| Test udført med slam fra Nivå Renseanlæg |                          |      |                           |      |
|------------------------------------------|--------------------------|------|---------------------------|------|
| Prøve                                    | Indsendte testresultater |      | Reviderede testresultater |      |
|                                          | EC20                     | EC50 | EC20                      | EC50 |
| A                                        | 83                       | 207  | 94                        | 208  |
| B                                        | 101                      | 252  | 48                        | 233  |
| C                                        |                          |      |                           |      |

*Tabel F.2 Indsendte og reviderede testresultater for laboratorium 4. EC-værdierne er angivet i mL/L for prøve A og B samt i mg/L for prøve C*

| Test udført med slam fra Nivå Renseanlæg |                          |      |                           |      |
|------------------------------------------|--------------------------|------|---------------------------|------|
| Prøve                                    | Indsendte testresultater |      | Reviderede testresultater |      |
|                                          | EC20                     | EC50 | EC20                      | EC50 |
| A                                        | 63                       | 172  | 40                        | 173  |
| B                                        | 175                      | 450  | 133                       | 318  |
| C                                        | 0,30                     | 1,50 | 0,61                      | 1,92 |

## **B I L A G G**

### ***Generel analysekvalitet og plots***



## ***B I L A G   H***

### ***Deltagernes bemærkninger***

| Laboratorium<br>nummer | Bemærkning                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                      | <p>A1 og B1 kørt d. 8/10: temperatur var for lav og nitrifikationshastighed for lav til brugbare resultater. Prøve C kørt den 9/10: nitrifikation var OK.</p> <p>Prøve A2 og B2 kørt d. 23/10: prøve B2 mislykket pga. mislykkede analyser af NO<sub>2+3</sub>. C2 ikke kørt pga. en misforståelse.</p>                                  |
| 2                      | <p>Prøver laves normalt på SCA ved brug af hurtigmetoder.</p> <p>Prøve C er ikke lavet pga. tidsmangel.</p> <p>SS i slam: 10,384 g/L. Vasket og behandlet iht. DS/EN ISO 9509 (1989) E punkt 5.2. Slutkoncentration i slammet 2,99 g/L.</p>                                                                                              |
| 3                      | <p>Den målte SS i testglassene er brugt ved beregning af raterne.</p> <p>SS i slammet er bestemt. Slammet centrifugeret 3000 RPM i 3 min. Vasket med medium. Centrifugeret igen. Resuspenderet i vand til SS på 10 g/L. 50 mL resuspenderet slam tilsat hvert testglas.</p> <p>1000 RPM ikke tilstrækkeligt til at adskille slammet.</p> |
| 4                      | <p>Test med eget slam er ikke udført pga. problemer på renseanlægget.</p> <p>Slam fortyndet 2,5 x inden brug. Ingen vask af slam, da vi har dårlige erfaringer med det.</p>                                                                                                                                                              |
| 5                      | <p>Der er udført en omprøve på prøve B.</p> <p>Bemærk, at ATU-koncentrationen her er 200 mg/L og ikke 50 mg/L.</p> <p>Slam er vasket med milliporevand og akklimatiseret ved beluftning i tempereret vandbad.</p>                                                                                                                        |

## ***B I L A G   I***

***Endelig metodeforskrift (REFLAB Metode 3:2004)***

# 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

*This method is based on DS/EN ISO 9509:1996. The method has been revised compared to DS/EN ISO 9509 with the purpose of improving comparability of test results obtained at different laboratories. The major changes are:*

- *Increased aeration to prevent inhibition from low oxygen content.*
- *Control of ammonium/ammonia concentration taking the content in the test portion into account.*
- *Requirement of a minimum concentration of ammonium/ammonia at the end of test.*
- *Adjustment of pH*
- *Duplicate determinations (DS/EN ISO 9509 has single determination).*
- *Control of sludge concentration, measured as mixed liquor suspended solids.*
- *Sampling from test glasses 2-3 times during test (DS/EN ISO 9509 prescribes sampling once).*
- *Requirements for handling of samples for nitrate + nitrite analyses.*

## Inhibition of nitrification in activated sludge

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,



## Inhibition of nitrification in activated sludge

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.

#### 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 super-

natant 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 (5.1) 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 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 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

3,5-dichlorophenol may be used as reference inhibitor. An interlaboratory testing based on the test described in this method was carried out in 2003. The results obtained with 3,5 dichlorophenol are shown in Annex A.

NOTE – Another reference inhibitor may be used e.g. 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.

## Inhibition of nitrification in activated sludge

**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  $\text{O}_2/\text{l}$ . The measured  $\text{O}_2$  concentrations are recorded.

Include control and reference glasses without test solution. The reference inhibitor 3,5-dichlorophenol (**5.4**) may be tested in five concentrations or in a single concentration e.g. 2 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

## Inhibition of nitrification in activated sludge

will be approx. 2.0 g MLSS/l ( $2.0 \pm 0.5$  g MLSS/l) (see Table A.1). The concentration of ammonium/ammonia nitrogen in the test glasses shall be  $\geq 4$  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 might 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 one of the replicate test glass within the first 60 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 in one of the replicate test glass within the first 30 minutes and at the termination of the test. Keep the oxygen concentration within 6-8 mg O<sub>2</sub>/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 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - 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 **(6.6)**. 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 B.

## 9 Calculation and expression of results

**9.1** Calculate the nitrification rate by means of linear regression using the analyzed concentration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N. Express the rate in mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - 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<sub>C</sub> is the nitrification rate in controls [mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N / (g SS · hour)]

N<sub>T</sub> is the nitrification rate in glasses with test substance or ATU [mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N / (g SS · hour)]

NOTE – Although the measurement of oxidized nitrogen is preferable, the percentage inhibition of ammonium/ammonia removal may be based on NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>-N concentration. However, this disappearance of ammonium/ammonia is not necessarily due to nitrification. Furthermore, ammonium/ammonia

## Inhibition of nitrification in activated sludge

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  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  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  $\text{O}_2/\text{l}$ .

The result of the reference inhibitor is compared with results of interlaboratory test and it is assessed whether the result is within the expected interval, i.e. mean value  $\pm 2 \cdot$  standard deviation found in the interlaboratory test (see Annex A).

It is important that the nitrification has taken place in the control, but it is essential that sufficient ammonium salt (i.e.  $\geq 4$  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  $\cdot$  h) and 6.5 mg N/(g SS  $\cdot$  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  $\cdot$  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.

If the nitrification rate is higher than 6.5 mg N/(g SS  $\cdot$  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 ratio will be changed and a different EC50 may result.

### 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 pretreatment method of the activated sludge;
- d) Measured data: Temperature, pH,  $\text{O}_2$ -concentration, MLSS measurements and analytical results of  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- - \text{N}$  and  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 - \text{N}$ ;
- 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 inhibitor;
- g) Any other facts, not specified in this Standard, that are relevant concerning the procedure followed.

2004.01.30

**Inhibition of nitrification in activated sludge**

**Annex A  
(informative)**

**Interlaboratory test results**

**Table A.1 – test results of 3,5 dichlorophenol (3,5-DCP)**

| Test organ-isms                                  | Participants | Number of test series | Outliers | Parameter                    | Mean value | Standard deviation |
|--------------------------------------------------|--------------|-----------------------|----------|------------------------------|------------|--------------------|
| Nitrifying activated sludge from different WWTPs | 5            | 8                     | 3        | EC50                         | 1,71 mg/l  | 0,50 mg/l          |
|                                                  |              |                       |          | Inhibition of 2 mg 3,5-DCP/l | 55%        | 8%                 |

## Inhibition of nitrification in activated sludge

Annex B  
(informative)

## Example for preparation of the test

Table B.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 <sup>1)</sup> (ml)                                                    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 5       |
| Water (ml)                                                                                | 100   | 99.75 | 99.2  | 97.5  | 92    | 75     | 95      |
| Stock solution <sup>2)</sup> 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                                          |       |       |       |       |       |        |         |
| 2) Stock solution: 100 mg of reference inhibitor per litre                                |       |       |       |       |       |        |         |
| 3) Stock solution: 1 g of test substance per litre                                        |       |       |       |       |       |        |         |
| NOTE - Undiluted test substance must not be allowed to come into contact with the sludge. |       |       |       |       |       |        |         |