



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp
Fakultet for realfag og teknologi

Potensiell påvirkning av nanosølv på biofilm i gråvannsrenseanlegg

Potential impact of nanosilver on biofilm in
greywater treatment plant

Chawan A. Ahmed
Vann- og miljøteknikk

Forord

Denne oppgaven er skrevet våren 2017, og avslutter mine fem år med studier av vann- og avløpsteknikk ved NMBU. Arve Heistad har vært hovedveileder for arbeidet, og Deborah Oughton har vært biveileder

En stor takk går til Arve Heistad for å ha gitt meg muligheten å studere denne oppgaven, og gitt meg tid og veiledning for å fullføre oppgaven på best mulig måte. Takk til Deborah Oughton som har hjulpet meg med å skaffe nødvendig utstyr og hjelp til studeringen av nanosølv.

Takk til ph.D student ved fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning, Lisa Magdalena Rossbach som har bistått meg i arbeidet med å påvise sølvpartikler i anlegget gjentatte ganger. Stor takk til Jon Fredrik Hanssen ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, for å ha brukt av tiden sin til å hjelpe meg med å arbeide og forstå mikrobiologien gjennom mikroskopiens verden. Videre vil jeg takke Fasil Ejigu Eregno, , Melesse Eshetu Moges, Philipp Kozin, Erik Joner og Claire Coutris for gode råd og hjelp med oppgaven.

Det ville vært vanskelig å fullføre denne oppgaven uten hjelpen fra ovennevnte, og støtte og oppmuntring fra kjente og kjære.

Chawan A. Ahmed

19.06.2017

Innhold

Forord	1
Forkortelser og definisjoner	4
Figurliste.....	5
Tabelliste	6
Sammendrag.....	7
Abstract	9
1 Innledning.....	11
1.1 Sentralisert vs. desentralisert avløpssystem.....	12
1.2 Naturbasert avløpsteknologi	13
1.3 Kretsløpsbasert avløpsteknologi.....	13
1.4 Gråvann og svartvann	14
1.5 Patogen i avløpsvann	14
1.6 Overlevelse og inaktivering av mikroorganismer i jord/ porøst filtermedia	15
1.7 Infiltrasjon	15
1.8 Grunnvann som drikkevannskilde	15
1.9 Organisk materiale og biofilm	16
1.10 Nitrifikasjon	17
1.11 Denitrifikasjon	17
1.12 Veksthastiget og omdanningshastiget.....	17
1.13 Antibiotikaresistens.....	18
1.14 Avløpsslam	19
1.15 Mål for oppgaven.....	20
2 Materialer og metoder	21
2.1 Deteksjon av Ag ⁺ i vannløsninger for gråvannsanlegget	22
2.1.1 Tørrstoffinnhold	25
2.1.2 Totalt suspendert stoff (TSS)	26

2.1.3	TEM	26
2.2	Kolonneforsøk	27
2.2.1	Tilsetting av AgNP.....	30
2.2.2	Heterotrophic plate count (HPC).....	31
2.2.3	Analysemetoder for Escherichia coli (E.coli) og koliforme bakterier (KB)	32
2.2.4	Kvantifisering av Ag ⁺ i filtermateriale	33
3	Resultater og diskusjon	34
3.1	Konsentrasjoner av sølv påvist i avløpssystemet	34
3.1.1	Tørrstoffinnhold	36
3.1.2	Totalt suspendert stoff	37
3.1.3	Transmisjonselektronmikroskop (TEM)	39
3.2	Eksponering av nanosølv (Ag-NP) til kolonneforsøk	41
3.2.1	Kjemisk oksygenforbruk (KOF) og biologisk oksygenforbruk (BOF ₅)	44
3.2.2	Koliforme bakterier (KB) og Escherichia coli (E.coli)	46
3.2.3	Heterotrophic plate count (HPC).....	48
3.2.4	pH.....	50
3.2.5	Temperatur	51
3.2.6	Ag ⁺ konsentrasjoner	51
3.2.7	Utslipp til miljø	55
3.3	Potensielle feilkilder og diskusjon av metode	56
4	Konklusjon	57
5	Referanser.....	58
	VEDLEGG A: Datagrunnlag for bestemmelse av konsentrasjoner i gråvannsanalyser	62
	VEDLEGG B: Resultater fra første analyserunde	62

Forkortelser og definisjoner

Ag	Sølv (<i>latin. Argentum</i>). Kjemisk symbol for atomnummer 47.
AgNP	Nanosølv (<i>Silver NanoParticle</i>)
ENP	Engineered nanoparticle
LOD	Deteksjonsgrense (eng. <i>limit of detection</i>) Det laveste instrumentsignalet eller måleverdien hvor det kan fastslås på et gitt konfidensnivå at en prøve er forskjellig fra en blank prøve, som ikke inneholder den komponenten det måles på.
LOQ	
nm	Nanometer ($10^{-9} m$)
TEM	Transmisjonselektronmikroskop
BOF/BOD	
KOF/COD	
HPC	Heterotrophic Plate Count

Figurliste

Figur 1 Skisse av grøfteoppbygginger. Oppbygging av filtertyperne. (Reiakvam, 2016)	23
Figur 2 Praktisk oppsett av kolonneforsøk.....	27
Figur 3 Størrelse i nanometer på nanopartikler ved de ulike fortynninger av NM-300K, med standardavvik. Utført med Malvern PN3702 Zetasizer.	30
Figur 5 Bildet viser det knuste filtermaterialet, før tilsetning av HNO ₃ og HCl.....	33
Figur 6 Gjennomsnittlig konsentrasjon av Ag (isotop 107) på alle prøvetakingspunkter i gråvannssystemet. Alle konsentrasjoner er oppgitt i µg/l. n=3	34
Figur 8 TEM bilde av nanopartikler i prøve tatt fra slamvann fra sekundærsedimentering. Skala er 500 nm (v) med synlige partikler på ca. 100 nm, og 100 nm (h) med minste synlige partikler på 10-20 nm.....	39
Figur 9 TEM bilde av nanopartikler i prøve tatt fra slamvann etter primærsedimentering. Skala er 100 nm. De minste synlige partikler her er <10 nm.....	40
Figur 10 TEM bilde av nanopartikler i prøve tatt fra ubehandlet gråvann. Skala er 200 nm. Det er nanopartikler i størrelsesorden 10-20 nm.....	40
Figur 11 Kjemisk oksygenforbruk i vannanalysene. De forskjellige fargekodene beskriver hvilken kolonne grafen gjelder for.	44
Figur 12 Biologisk oksygenforbruk (BOF ₅) i vannanalysene. De forskjellige fargekodene beskriver hvilken kolonne grafen gjelder for.	45
Figur 13 Totale antall koliforme bakterier per 100 ml i vannprøver ved start og etter 14 dager.	46
Figur 14 Antall E.coli per 100 ml vannprøve ved start og etter 14 dager.	47
Figur 15 Antall dyrkbare bakterier målt i CFU/ml, ved platespredning (HPC).....	48
Figur 16 Vekst av bakterier.....	49
Figur 17 HPC i CFU/ml for filtermediet etter 14 dager.	49
Figur 18 pH ved start og etter 14 dager.....	50
Figur 19 Konsentrasjoner av Ag (isotop 107) for de forskjellige konsentrasjoner.....	51
Figur 20 Skjebnen til 0,1 mg/l tilsatt nanosølv i det biologiske gråvannssystemet.	52
Figur 21 Skjebnen til 1 mg/l tilsatt nanosølv i det biologiske gråvannssystemet.	53
Figur 22 Skjebnen til 10 mg/l tilsatt nanosølv i det biologiske gråvannssystemet.....	54

Tabelliste

Tabell 1 Kjemisk sammensetning av Filtralite NR 2-4 mm [47].....	27
Tabell 2 Vekt av prøvene før og etter tørkeskap	36
Tabell 3 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra primærsedimentering (1)	37
Tabell 4 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra sedimentærsedimentering (2)	37
Tabell 5 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Startverdi for alle kolonner.	37
Tabell 6 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra referansekolonne (3) .	37
Tabell 7 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra kolonne med lav konsentrasjon av Ag (4)	37
Tabell 8 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra kolonne med middels konsentrasjon av Ag (5)	38
Tabell 9 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra kolonne med høy konsentrasjon av Ag (6)	38
Tabell 10 Log ₁₀ reduksjon av E.coli og koliforme bakterier løpet av prøveperioden-	47
Tabell 11 Prøver av filtermaterialet. Verdiene er oppgitt i mg/kg tørrstoff.	52
Tabell 12 UltraWAVE, andre forberedelse til andre runde med ICP-MS. 05.04.17	Feil!
Bokmerke er ikke definert.	
Tabell 13 Resultater fra ICP-MS 10.04.17. Konsentrasjonene i µg/L som er funnet er ved 10x fortynninger.....	62
Tabell 14 Analyseresultater for Ag 109 i µg/l.....	62

Sammendrag

Det stilles spørsmål om det økende antallet forbrukerprodukter basert på nanomaterialer og deres potensielle påvirkning til miljøet. Nanopartikler av sølv har sterke antibakterielle egenskaper, som kan påvirke den biologiske renseprosessen i avløpsrenseanlegg. For å bestemme effekten av nanosølv på biologisk renseprosess, ble gråvann fra et stor-skala gråvannsrenseanlegg hentet og tilsatt 0.1 mg/l, 1.0 mg/l og 10 mg/l nanosølv. Dette vannet fikk sirkulere i minikolonner 14 dager gjennom et høyt belastet filtermedie, lik den som blir brukt i gråvannsanlegget. Det ble i tillegg satt inn et referansesystem som ikke var tilsatt noe nanosølv, for sammenligning. Filtermediet ble inokulert med samme biofilm som den i gråvannsrenseanlegget. Basert på platespredning (heterotrophic plate count- HPC), var det ingen signifikant reduksjon i antall dyrkbare bakterier i filtermediet.

Infiltrasjonsskolonnene dannet seg biofilm. Det ble bekreftet at nanosølv har ingen effekt på nitrifikasjonsprosessene. Dermed blir evnen til å danne biofilm ikke svekket. For fjerning av koliforme bakterier og *E.coli*, viste det seg at tilstedeværelsen av nanosølv kan bidra med å fjerne flere bakterier, enn når avløpsvannet er uten. Kjemisk oksygenforbruk (KOF) og biologisk oksygenforbruk (BOF₅) ble redusert opp til 70% i alle kolonner med hensyn på KOF, 90-99% med hensyn på BOF₅. Dette er tilfredsstillende resultater, spesielt med hensyn på BOF₅, da det vil si at vannet har lite organisk materiale som ikke fører til stort oksygenforbruk når det kommer ut til vassdrag. Det som ble igjen av på KOF målingene er antatt å være tungt løselig partikulært materiale, det vil si ikke raskt nedbrytbart materiale.

Sølvpartikler i vannfasen og i filtermediet ble målt, samt sedimentert materiale i beholderne ved endt forsøk. Vannfasen inneholdt kun ~15% av den tilsatte konsentrasjon i kolonnen med høyest konsentrasjon etter 8 dager, og ~12% etter 14 dager. For kolonnen med middels konsentrasjon, inneholdt den ~26% etter 8 dager og ~24% etter 14 dager. Kolonnen med minst konsentrasjon hadde ~40% etter både 8 og 14 dager. Størst reduksjon var det i starten for alle kolonnene. Etter hvert så det ut til at konsentrasjonen jevnet seg ut og holdt på den samme mengden sølvpartikler som sirkulerte i vannet og filtermediet. Det ble funnet høyest konsentrasjon av sølvpartikler i filtermediet for kolonnene med høyere konsentrasjoner. Derimot andelen som var hadde senket seg ned til bunns og bundet seg til sedimenterte partikler i beholderen var høyest for den laveste tilsatte konsentrasjonen, med hele 51% som ble funnet igjen i sedimenterte partikler.

Filtermediet i alle kolonnene ble knust, tilsatt saltsyre og salpetersyre og dekomponert, for bedømmelse av sølvpartikler. Det viste seg at ~1% ble bundet til filtermediet i kolonnen med 0,1 mg/l nanosølv, ~35% ble bundet i 1,0 mg/l nanosølv og ~14% i kolonnen med 10 mg/l med nanosølv. Det var mye sølvpartikler som ikke ble funnet i alle kolonnene. Det kan skyldes at ekstraksjonene ikke var gode nok.

For gråvannsrensesystemet som henter inn gråvann fra 24 studentboliger, ble det tatt prøver på forskjellige punkter for å spore sølvpartikler. Prøvene viste at ~90% av sølvpartiklene som ble funnet, var bundet til avløpsslammet i sedimentasjonskamrene. Bilder som ble tatt med transmisjonselektronmikroskop viste aggregerte partikkelstørrelser helt ned i 10 nm.

Både kolonneforsøket og sporing av sølvpartikler i gråvannsrensesystemet viser tydelige tall på at sølvpartikler binder seg i store mengder til slam. Slamvann som brukes til jordforbedring kan da inneholde mye sølvpartikler. Hvor mye dette slamvannet fra avløpsrenseanlegg kan påvirke planter, mat og mikrobiell diversitet i jorda, må studeres videre for vurdering av deres effekter.

Abstract

The increasing number of nanomaterial based consumer products raises concerns about their possible impact on the environment. Silver nanoparticles have strong antibacterial properties, which may affect biological wastewater treatment process. To determine the effect, greywater was collected from a local on-site wastewater treatment plant for greywater and added 0.1, 1 and 10 mg Ag/L, circulating for 14 days to highly loaded infiltration columns. In addition, a reference was not added nanosilver to compare with. The columns were inoculated with the same biofilm as in the greywater treatment plant beforehand. Based on heterotrophic plate counts (HPC) there was no significant reduction in cultivable bacteria in the biofilms.

The infiltration columns did grow well-established biofilm. It was confirmed that the presence of nanosilver will not affect the ability to grow biofilm, nor did it affect the removal of microorganisms and organic matter in the circulating greywater. It had also no effect on nitrification processes (microbial activity was not inhibited). Biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) were reduced respectively up to ~70% and 90-99% in each column in a time interval of 14 days.

Silver particles was present with concentrations of ~40, ~263 and ~1543 ug/l after 8 days, and 40, 242, 1198 ug/l after 14 days in the water of the 0.1, 1.0 and 10 mg/l columns. The filter materials in the four different columns were crushed, added HNO₃ and HCl, and determined for silverparticles content. There results were that the silver particles was bound less to the filtermaterial in the coloums with less nanosilver, that the columns with higher concentrations.

For the on-site treatment plant, the fate of silver, particularly nanosilver, was tracked in the different environments. The results show that more than 90% of the nanosilver found in the different environments was attached to sludge flocs. The untreated greywater contained an average concentration of 0.52 µg/l as determined by inductive coupled mass spectrometry (ICP-MS). Most of the nanosilver was found in primary sedimentation tank, bound to the sludge, which contained an average concentration of 26 µg/l. Transmission electron microscope (TEM) images reveal nano-nature of particles. Size measurements showed particles to be in the defined nanosize range, with a size ranging from 10-100 nm.

If products containing silver nanoparticles become a common feature of households in the future, wastewater will contain significant loadings of nanosilver particles, which might be released into the environment. The results indicate that high loadings of nanosilver that we does not affect the removal efficiency of certain parameters in a small infiltration system. This may

indicate that wastewater biofilms are highly resistant to nanosilver particles. Further studies must be done to show the overall effect with extreme loadings. As silver in general become less soluble when transported to wastewater treatment plants, and interacting with sludge and soil, one must take into account possible chemical and particle transformations upon environmental entry.

It is determined that most of the nanoparticles end up in sludge flocs. This can be good (easy removal in wastewater plants) and this can be potentially bad when this sludge is used in crop fields. Will that affect humans if the food in the crops absorbs nanosilver? And is it a concern that microorganisms can start to get resistant to such a commonly used antibiotic?

1 Innledning

Bruken av sølv har vært utbredt siden gammel tid. Den har vært lenge kjent for sine antimikrobielle egenskaper, derav tradisjonen med å kaste (sølv)mynter i brønn. Kolloidalt sølv og nanosølv er det som betegner sølvpartikler som er generelt mindre enn 100 nanometer [1]. Nanosølv er brukt som et antibakterielt materiale i mye produkter- alt fra medisinsk utstyr, i optikk, maling, matemballasje, kosttilskudd, tekstiler, elektronikk, hvitevarer, vanddesinfeksjonsmidler, romspray, kosmetikk og klær [2-5]. Det er estimert å produseres omtrent 5,5-550 tonn med nanosølv per år [6]. Det foreligger likevel store mørketall blant disse tallene.

Av de mer enn 1000 forbrukerproduktene som hevder å inneholde nanomaterialer, inneholder mer enn en fjerdedel av dem nanosølv [4]. I oktober 2013 var det 383 forbrukerprodukter som inneholdt nanosølv noe som gjør nanosølv til det mest brukte nanomaterialet i over 5 år [7]. Det er foreløpig vanskelig å spore produkter med nanosølv fordi produktene pakkes ofte under forskjellige merkenavn, og dagens merkeforskrift krever ikke at nanomateriale skal være oppført som en ingrediens.

Sølv presenteres ofte som et alternativ eller et supplement til antibiotika, og det har blitt foreslått at antiresistans mot sølv ikke forekommer. Historien forteller oss noe annet, og spørsmålet er heller ikke om en bakterie vil utvikle motstand mot et antimikrobielt stoff, men når det vil gjøre det. Når sølv blir brukt i klær, sko, tannbørste og altmulig annet for å bekjempe bakterier uten omtanke, kan det til og med forverre et alvorlig problem som allerede finnes. En svensk doktorgradsavhandling bekrefter imidlertid dette [8]

En rapport utgitt av European Commission (2009) identifiserer biocider som en potensiell risikofaktor for utvikling og spredning av antibiotikaresistens. Biocider er kjemiske stoffer som har egenskaper som ligner på antibiotika- hindrer mikrobiell aktivitet, og de er mye brukt i helsevesenet som desinfeksjonsmidler og konserveringsmidler. Selv om biocider kan ha samme effekt som antibiotika, er det lite kontroll på bruken av det, og det er en betydelig mangel på kunnskap på dette feltet.

Den økende og mer varierte anvendelsen av nanosølv øker faren for frigjøring av disse partiklene fra produkter i miljøet. Det er uunngåelig at nanopartikler av sølv (AgNP) vil komme ut i avløpsvann i forhold til den høye forbruksgraden. Beregninger som er gjort på grunnlag av eksponeringer av nanosølv til miljøet, viser at akvatiske organismer kan bli skadet av nanosølv som er tilstede i avløpet fra renseanlegg [9]. Flere studier som omhandler de toksikologiske

effektene av nanosølv på organismer i vannmiljøet, har vist at uberørte nanopartikler av sølv fremkaller sterke toksiske effekter på fisk [10, 11], dafnier [12] og alger [13]. Det er også rapportert toksiske virkninger på organismer i økosystemer, for eksempel på meitemark og reproduksjon [14-16] og mikrobiell biomasse og enzymaktivitet i jord [17]. Disse studiene gir viktig informasjon om risikokarakterisering. I tillegg kan disse nanosølvpartiklene potensielt forårsake uønskede virkninger på mikrobielle miljøer i biologiske avløpsvannsystemer, på grunn av deres antimikrobielle egenskaper.

Studier viser at frigitt nanosølv til miljøet gjennomgår flere omdannelser som påvirker biotilgjengeligheten, toksisiteten og risiko [18]. Spesielt kan dannelsen av komplekser med sulfider sterkt redusere biotilgjengelighet av sølvioner og toksisitet, under visse omstendigheter. Hvis organisk/ sulfidbelegg eller kompleksing i naturlig vann reduserer biotilgjengeligheten av sølvpartikler, vil risikoen for naturlig vann bli redusert.

Det er påvist at så mye som 80-100% av sølvet er anslått å være bundet til slammet i avløpsrensaneanlegg [19], som deretter anvendes på landbaserte miljøer som jordforbedring.

De betraktninger nevnt ovenfor, gir grunnlaget for følgende avhandling som ser på ett spesifikt rensaneanlegg i Ås kommune. Det med hensyn på nanosølv og dens virkninger. Resten av kapittelet gir et teoretisk grunnlag av oppgaven, før i det neste kapittelet det kommer en beskrivelse av hvordan resultatene har framkommet.

1.1 Sentralisert vs. desentralisert avløpssystem

Omtrent 20% av befolkning i Norge bor i spredt bebyggelse., det vil si at de ikke er knyttet til sentrale, felles vann- og avløpsverk. I norsk sammenheng er desentrale avløpsløsninger ofte definert som system som det er mindre enn 50 PE tilknyttet [20].

Det er mange faktorer som avgjør om en desentral løsning er god for en gitt situasjon. Det kan være sosiale, miljømessige og økonomiske faktorer som avgjør blant annet. Kunnskapen til de som skal prosjektere og drive anlegget er også en viktig faktor [21].

Desentralisert avløpsløsning er et system der avløpsvannet blir samlet og beholdt nært kilder, uten bruk av et langt ledningsnett. Det er mindre risiko for lekkasje og infiltrasjon av fremmedvann. Sentraliserte systemer kan bli dyre for de som bor i spredt bebyggelse, samtidig kan allerede sentraliserte løsninger gi et mindre behov for desentraliserte løsninger, i og med at

de er mer konkurransedyktige på pris. Det er færre utslippspunkter ved et sentralisert avløpsrenseanlegg, i forhold til et desentralisert, også er det mulig med stordriftsfordeler.

1.2 Naturbasert avløpsteknologi

Naturbasert avløpsteknologi er rensemetoder som tilrettelegges for å benytte naturens egne selvrensingsprosesser, med eller uten resirkulering av næringsstoffer til planteproduksjon. Det er minst mulig bruk av tekniske installasjoner som krever tilførsel av energi, kjemikalier og arbeidskraft.

Det er blitt utviklet et mangfold av naturbaserte systemer som baserer seg på bruk av jord, vegetasjon, mikroorganismer og fisk [22-27]. Vi kan dele systemene inn i jordbaserte rensemetoder, jord- og plantebaserte rensemetoder (våtmark), akvatiske rensemetoder, og systemer med kildeseparering eller kretsløpsbaserte systemer. Systemene krever ofte store areal- spesielt i kaldt klima. Det er derfor mest aktuelt for små renseanlegg eller der det ikke er begrensninger for arealbruk. Utviklingen går mot mer kompakte systemer med kortere oppholdstid, bedre forbehandling og bruk av tekniske komponenter som pumper med tids- og mengdestyring [28]. I og med at det bygges mer kombinerte systemer, så er det ingen skarp grense mellom konvensjonell og naturbasert rensning.

1.3 Kretsløpsbasert avløpsteknologi

Med kretsløpsbasert avløpsteknologi menes rensesystemer som er optimalisert for å bringe ressurser i avløpet som næringsstoffer (N, P, K) og organisk materiale (energi) og vann inn et kretsløp. Vanligvis er ikke anleggene optimalisert for dette. Kretsløpsbaserte avløpsløsninger er under utvikling, da det finnes filtre som kan binde fosfor og brukes til jordforbedring. Komposteringsanlegg gir et godt kretsløp av næringsstoffer, dersom komposten brukes i planteproduksjon. Det er flere løsninger på dette, blant annet slamavskillere, jordinfiltrasjon, sandfiltre og andre filtre med lav belastning (biofiltre), våtmarksfiltre/filterbed anlegg, biodammer, luftedammer, konstruerte våtmarker foruten ulike toalettssystemer basert på kompostering [29]. For eksempel kan fekalier og urin skilles i toalettet og få ulik behandling, eller at gråvannet skilles fra avløpet og behandles separat.

Utfordringen med denne teknologien er at håndteringen av ressursene ikke medfører økt hygienisk risiko sammenlignet med andre metoder, at brukerne er komfortabel med løsninger

og at metodene er kostnadseffektive sammenlignet med annet behandling. Det blir hevdet at kretsløpsløsninger er de mest bærekraftige og mer fremtidsrettet [30, 31]

1.4 Gråvann og svartvann

Avløpsvann kan deles inn i to kategorier, svartvann og gråvann. Svartvann er avløpsvann som kommer fra toalettene, det vil si at all urin, avføring og toalettpapir. Gråvann er det resterende avløpet fra husholdningen. Det vil si avløpet fra bad, oppvask- og vaskemaskin og håndvask [32]. Noen deler opp gråvannet i ulike fraksjoner igjen; avløp fra kjøkken og vaskemaskin i en fraksjon som kalles mørk gråvann, mens resten av gråvannet som kommer fra håndvask, dusj og badekar i en annen fraksjon som kalles lyst gråvann. Gråvann generelt utgjør omtrent 50-80% av husholdningers avløpsvann [33]. I denne oppgaven skilles det ikke mellom lyst og mørkt gråvann.

De fleste av patogene organismer i kommer fra svartvannet. En statistisk litteraturstudie av 130 ulike vitenskapelige artikler viser medianverdiene for innholdet av totalt suspendert stoff (TSS), biologisk oksygenforbruk (BOF5), kjemisk oksygenforbruk (KOF), total-nitrogen og total-fosfor i summen av urin og avføring var forholdsvis 95 g/PE*d, 25 g/PE*d, 70g/PE*d, 11,9 g/PE*d og 1,5 g/PE*d. Disse verdiene og konsentrasjonene i svartvannet varierer mye etter hvor mye vann et toalett bruker til spyling, og kosthold og kultur mellom ulike individer og regioner [34].

1.5 Patogen i avløpsvann

Virus er mikroorganismer mellom 0,002 – 1 µm. De kan ikke formere seg uten vertscelle. De har en proteinkappe som omgir og beskytter arvestoffet til viruset [35]. Blir denne kappan ødelagt, vil viruset inaktiveres. Virus som stammer fra tarmen gir høy infeksjonsrisiko for mennesker. Virus er ofte mer motstandsdyktige enn bakterier mot desinfisering og de er vanskelige å påvise med standard laborieteknikker [36].

Bakterier er encellede organismer mellom 0,2- 2 µm i diameter og 2- 8 µm lange [36]. De har ikke DNA inn i en membran, men vanligvis har et sirkulært kromosom. Bakterier formerer seg ved celledeling. Mange bakterier har flere nyttige funksjoner og trenger ikke være farlige for mennesker.

***E. coli* som indikator- og modellorganisme**

E.coli er en gram-negativ, stavformet koliform bakterie, som vokser i tarmen på varmblodige dyr. Funn av *E.coli* tyder på fekal forurensning av vann [37]. Den blir transportert lett i jord og har lav utdødningsrate. Dette gir den de gode egenskapene som modellorganisme.

1.6 Overlevelse og inaktivering av mikroorganismer i jord/ porøst filtermedia

Det er påvist at virus er i stand til å transportere betydelige avstander gjennom jord, avhengig av deres størrelse, deres adsorpsjonsegenskaper og deres grad av inaktivering. I grunnvann er utholdeligheten til mikroorganismer påvirket av klima, regnskyll og temperatur. Biologiske prosesser som påvirker transporten av bakterier er styrt av egenskapene som innehas av mikrobiell komponent av systemet, deriblant vekstfase [38, 39] sult [40], motilitet og metabolsk aktivitet.

1.7 Infiltrasjon

Infiltrasjon er den vanligste renseløsningen i spredt bebyggelse både i Skandinavia og USA [29]. Store infiltrasjonsanlegg bygges ofte som åpne bassenger, mens små anlegg bygges som lukkede grøfter eller bassenger. Det er også mulig å ha anlegget på bakken, dersom det ikke er tilstrekkelig jorddybde til at infiltrasjonsgrøfter kan graves ut. Dette kalles for infiltrasjon i jordhaug. Det er vanlig å ha en slamavskiller som forbehandling til infiltrasjon.

Grunnvann er den primære resipienten til infiltrasjonsanlegg. Dette innebærer at infiltrasjonsanlegg lokaliseres og utformes slik at det ikke forurenses grunnvann. Det er godt dokumentert at infiltrasjonsanlegg renser godt overfor tradisjonelle forurensningsparametere

Lettklinker er et vanligste filtermediet som vekstmedium. Et biofilter av lettklinker har en stor partikkeloverflate som lett overstiger $5000 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Fordelingen av vannet over filtermaterialet er avgjørende for å utnytte denne overflaten til dannelselse av biofilm. Det må være god fordeling og spredning av vannet gjennom dysen til filteret.

1.8 Grunnvann som drikkevannskilde

Grunnvann er et tema med mange sider og utfordringer. Grunnvann er det vannet som fyller porer og sprekker i grunnen. Grunnvannsspeil er grunnvannets overflate, og defineres som den flaten der grunnvannstrykket er lik atmosfærestrykket. I grunnvannssonen er porene og

sprekkene fullstendig fylt med vann. Denne sonen kalles for den mettede sonen. Der hvor hulrommene er delvis fylt med vann, kalles det for umettet sone. (NGU)

Det er nedbør og smeltevann som renner ned i bakken som er de viktigste årsakene til dannelse eller mating av grunnvann. Denne prosessen kalles infiltrasjon, og er avhengig av løsmassens permeabilitet, det vil si gjennomtrengeligheten.

I følge drikkevannsforskriften §12 skal drikkevann «når det leveres til mottakeren, være hygienisk betryggende, klart og uten framtrædende lukt, smak eller farge. Det skal ikke inneholde fysiske, kjemiske eller biologiske komponenter som kan medføre fare for helseskade i vanlig bruk». Det forekommer naturlig kjemiske stoffer som jern, mangan, fluor, arsen og radon), og mikroorganismer.

Grunnvann blir ofte foretrukket som kilde til drikkevann, på grunn av sin høyere kvalitet [41]. Vannet er beskyttet gjennom jord fra direkte forurensning. Mekanismene støtter fjerning av patogener og andre forurensninger [42, 43].

Overflatevann er derimot mer utsatt for forurensning, og har et høyere risiko for å være patogener. Kvaliteten på overflatevann varierer mye mer, noe som gjør det mindre attraktivt som drikkevann [44].

1.9 Organisk materiale og biofilm

Nesten all jord inneholder organisk materiale. Organisk materiale er en samlebetegnelse for materiale som inneholder karbonatomer. Nedbrutt husdyrgjødsel og planterester, samt humus er viktige deler av jordas organiske materiale. Høyt innhold av organisk materiale gir jorda gode egenskaper når det gjelder jordstruktur, og evne til å holde på vann og næring, samtidig som disse er tilgjengelig for planter.

Når avløpsvann risler over jord eller porøst medium som sand, grus eller lettklinker, vil det feste seg et tynt lag med bakterier til jordoverflaten [29]. Dette bakterielaget kalles for biofilm.

Nedbrytning av organisk materiale er en mikrobiell prosess som medfører at mesteparten av karbonet blir omdannet til CO₂, mens nitrogen, fosfor og andre næringsstoffer frigjøres. Nedbrytningsprosessen avhenger av mange forhold

1.10 Nitrifikasjon

Nitrifikasjonsprosessen utføres av en meget begrenset gruppe autotrofe mikroorganismer. Prosessen skjer i to trinn. Ammonium oksideres til nitritt, og deretter til nitritt og nitrat. Disse bakteriene som sørger for disse prosessene, omtales som nitrifikanter eller nitrifikasjonsbakterier. Organisk bundet nitrogen i innløpsvann omsettes av heterotrofe bakterier til ammonium som kommer i tillegg til det frie ammonium som var i vannet i utgangspunktet. Dette er en oksygenforbrukende prosess som vil skje ute i resipienten om det ikke skjer i renseanlegget. Det må sørges for høy nitrifikasjon, i tillegg til BOF_5 fjerning. Det framgår at jo større renseseffekten med hensyn på BOF_5 er, desto større vil andelen av nitrogen-oksygen-forbruket (NOD) være, dersom det ikke gjennomføres nitrifikasjon i prosessen. Ammonium vil ved nitrifikasjon forbruke omtrent $4,5 \text{ O}_2/\text{g NH}_4\text{N}_{\text{oksidert}}$ [20]. Dersom utslippet går til en oksygen svak resipient, bør avløpsvannet nitrifiseres. Dessuten er ammoniakk toksisk overfor fisk. Jo høyere pH, desto høyere innhold av ammoniakk. I en nitrifikasjonsprosess, vil man få et fall i pH.

Nitrifikasjon kan forløpe i lavt belastede biologiske anlegg, der det organiske stoffet allerede er nedbrutt av heterotrofe mikroorganismer til lave verdier. De nitrifiserende bakteriene har lav veksthastighet.

1.11 Denitrifikasjon

Biologisk nitrogenfjerning består av en to prosessstrinn:

- Nitrifikasjon som oksiderer ammonium til nitritt og nitrat
- Denitrifikasjon som reduserer nitritt og nitrat til nitrogen gass

Nitrogen gass i vannet fjernes ved at den unnviker til luften. Denne prosessen foregår i anaerobe forhold, og er svært vanlig ute i naturen der nitrat er tilstede. Organisk stoff er også være en begrensende faktor på denitrifikasjon.

1.12 Veksthastighet og omdanningshastighet

De bakteriene som sørger for aerob nedbrytning av organisk stoff, er det vi kaller for heterotrofe bakterier. Disse er karakterisert ved at de bruker organisk stoff til energiproduksjon og vekst.

Det er flere faktorer som innvirker på veksthastighet og omdanningshastighet hos mikroorganismer. Mikroorganismer trenger først og fremst tilgang på næringsstoffer. Man kan regne med at behovet for næringsstoffer er som: 100 (BOF₅) : 5 (nitrogen) : 1 (fosfor) [20]. Temperatur har også innvirkning på veksthastigheten til mikroorganismer. Jo lavere temperatur, desto lavere vekst. Omdanningshastigheten er omtrent dobbelt så høy ved en temperatur som er 10°C høyere [45].

$$r_T = r_{10} * \theta^{(T-10)}$$

Formel 1 Omdanningshastigheten ved 10°C.

T = er den aktuelle temperatur

θ = en temperaturkoeffisient som i aerobe prosesser normalt ligger i området 1,05- 1,10.

De fleste mikroorganismer som er aktuelle i biologiske renseanlegg vokser i pH-området 5-9. Det er optimal vekst rundt nøytral pH. Denitrifikasjonsprosessens pH-avhengighet har optimum ved pH= 7,5-8,5.

Oksygen vil hemme denitrifikasjonsprosessen, men det er mulig å ha denitrifikasjon selv om det er en viss oksygenkonsentrasjon i vannet. Det er ikke den oksygenkonsentrasjonen i vannet som er avgjørende, men den man har i fnokker eller biofilm der denitrifikasjon foregår.

Biologiske prosesser kan inhiberes av flere typer stoffer. Heterotrofe bakterier er store grupper av bakterier, så dersom en gruppe bakterier inhiberes, vil en annen gruppe kunne overta funksjonen til den andre gruppen. Derfor vil ikke inhibering merkes lett ved heterotrof vekst. Ettersom nitrifikasjonsbakteriene er så spesifikke med hensyn på hvilken funksjon de har, er det ingen andre bakteriegrupper som kan overta funksjonen deres dersom de inhiberes. De er likevel ikke mer følsomme overfor giftstoffer enn heterotrofe bakterier.

1.13 Antibiotikaresistens

Antibiotika resistens er motstanden av en mikroorganisme i et antimikrobielt stoff som opprinnelig var effektiv for behandling av infeksjoner forårsaket av den. Feil bruk av antibiotika kan føre til utvikling av resistente bakterier. Det betyr at antibiotika ikke lenger har

effekt på disse bakteriene. Bakteriene kan leve videre, formere seg og fremkalle eller forverre sykdom.

Resistente mikroorganismer (inkludert bakterier, sopp, virus og parasitter) er i stand til å motstå angrep av antimikrobielle stoffer, slik som antibakterielle legemidler (f.eks. antibiotika), soppmidler, antiviruset midler og antimalariamidler, slik at vanlige behandlinger blir ineffektive og infeksjoner vedvarer.

Utviklingen av resistente stammer er et naturlig fenomen som oppstår når mikroorganismer reproducerer seg feilaktig eller når resistente egenskaper utveksles mellom dem. Bruk og misbruk av antimikrobielle stoffer akselererer fremveksten av resistente stammer. Vanlige infeksjon kontroll praksis, utilstrekkelige sanitære forhold og upassende mat-håndtering oppfordrer videre spredning av AMR.

Infeksjoner forårsaket av resistente mikroorganismer klarer ofte ikke å svare på standard behandling; noe som resulterer i langvarig sykdom, høyere helseutgifter, og en større risiko for død.

1.14 Avløpsslam

I Norge blir 80% av slammet benyttet som organisk gjødsel. 60% blir brukt i jordbruket og 20% blir brukt på grøntarealer. Når slammet fjernes fra vannbehandlingsdelen i et avløpsrensaneanlegg, inneholder det tungmetaller, organiske mikroforurensninger (miljøgifter) og kan være smittefarlig ved at det inneholder patogene mikroorganismer. Slambehandling omgjør slammet til en tilstand hvor det ikke skaper problemer for omgivelsene. Det settes maksimumgrenser til for slammets innhold av de ulike komponenter. Slammet skal ha gjennomgått hygienisering, stabilisering og avvanning.

Gjødselvereforskriften §10-2 oppgir «*Den som produserer eller omsetter produkter etter denne forskrift skal vise aktsomhet og treffe rimelige tiltak for å begrense og forebygge at produktet inneholder organiske miljøgifter, plantevernmidler, antibiotika/kjemoterapeutika eller andre miljøfremmede organiske stoffer i mengder som kan medføre skade på helse eller miljø ved bruk.*». Organiske miljøgifter defineres som organiske stoffer som selv i lave konsentrasjoner etter kort eller langvarig påvirkning kan ha skadepåvirkning på levende organismer.

Det er samtidig ikke lov å spre slam på arealer der det dyrkes grønnsaker, poteter, bær eller frukt. Der slam er spredt kan det først dyrkes slike vekster minimum tre år etter siste sprededato.

Tungmetaller kan deles inn i essensielle og ikke-essensielle [46]. De essensielle tungmetallene har mikronæringsstoffer for både planter og dyr. De ikke-essensielle tungmetallene har ingen biologisk funksjon og er derfor generelt uønsket. Sølv (Ag) er blant de ikke essensielle tungmetallene.

1.15 Mål for oppgaven

I Ås kommune er det blitt sendt ut søknad til Norges forskningsråd som tar utgangspunkt i Bærum kommune, og kikker helt spesifikt på ett boligområde hvor de kan tenke seg å bygge et desentralt system som avlaster det sentraliserte systemet. Tanken er å ha et kretsløpsbasert system hvor du tar vare på næringsstoffer, energi og vann i størst mulig grad. Det stilles spørsmål til om vi klarer å ha kontroll ved små lokale kretsløp, med hensyn på lukt, smitterisiko og andre effekter på helse og på miljø. Det er av interesse å se på det lokale kretsløpet, og hvilke konsekvenser det har hvis vi går radikalt i gang. Det blir tatt inn momenter fra andre fagområder inn i jobben mot et fremtidig VA-system. I denne oppgaven er tema miljøgifter. Avløpssystemet er der hvor mange miljøgifter havner, blant annet nanosølv, og i den sammenheng er satt som hovedmål for oppgaven å finne ut:

- om nanosølv fra tøyvask og andre forbrukerprodukter som kommer i avløpet påvirker den biologiske renseprosessen i et gråvannsrensesanlegg,
- i hvilken grad nanosølv holdes tilbake, og hvor det blir av sølvpartiklene
- hvilke renseprosesser som holder tilbake mest sølvpartikler i et stor-skala anlegg og hvilke påvirkninger utslipp har fra gråvannsrensesanlegg på miljøet

2 Materialer og metoder

I denne oppgaven ble det tatt prøver av et biologisk gråvannrensaneanlegg på forskjellige prøvepunkter for deteksjon av sølvpartikler (Ag^+). Videre ble det utført et eksperiment på 14 dager for å måle forskjellige parametere i avløpet, med tilsatt nanosølv.

Eksperimentet, som var et kolonneforsøk, ble gjort på 3 nivåer for å avgjøre om nanosølv (Ag-NP) forårsaker negative virkninger på de biologiske forholdene i løsmasser. I kolonneforsøket ble det målt på forskjellige parametere for å finne ut om utslippet fra de forskjellige kolonnene påvirker miljøet, og i hvilken grad nanosølv ble holdt tilbake. Det ble holdt fokus på:

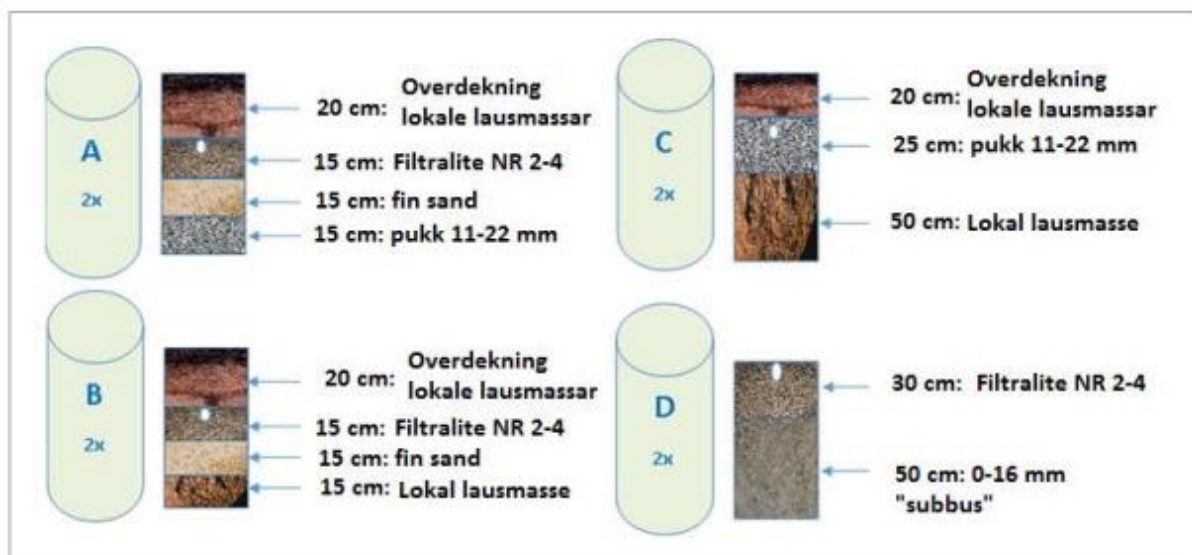
- Biofilmdannelse
- Kjemisk oksygenforbruk (KOF)
- Biologisk oksygenforbruk (BOF_5)
- Koliforme bakterier (KB) og *Escherichia coli*
- Antallet dyrkbare bakterier ved HPC-metoden (heterotrophic plate count)
- pH
- Absorpsjon av nanosølv til filtermateriale ved å måle konsentrasjon av sølvpartikler/kg tørrstoff (TS), samt
- Konsentrasjonen av nanosølv i vannfasen

2.1 Deteksjon av Ag⁺ i vannløsninger for gråvannsanlegget

Gråvann renner fra 24 studentboliger til en slamavskiller og pumpet til en septiktank av glassfiber i et laboratorie på NMBU. Dette er første prøvetakingspunkt for forsøket. Fra septiktanken blir gråvannet pumpet med en sentrifugalpumpe (Tsurumi 40U) og tas imot med en 1500 l ståltank med omrørere som går i 30 omdreininger/min. Todt et al. 2015 har beskrevet og estimert oppholdstiden til å være omtrent 36-48 timer. Pumpen er plassert et stykke over bunnen i tanken, for å unngå å dra med seg sedimentert stoff. Gråvannet blir så pumpet med to slangepumper til det kompakte rensenanlegget A02 (Ecomotive A02, Ecomotive AS, Runde, Norge). Disse slangepumpene leverer gråvann i et tidsmønster som er lik i en vanlig husholdning. Det vil si høyt forbruk på morgenen og kveld, og lite forbruk på natta og midt på dagen.

Det kompakte rensenanlegget A02 er laget for å rense gråvann fra hus og hytter. Gråvannet kommer først inn i en kanalformet sedimentasjonstank. Vannprøver hentet herfra er kalt primærsedimentering. Etter dette blir vannet pumpet med en vippestyrt sentrifugalpumpe, hver 10. minutt, i 10 sekunder. Dette er neste prøvetakingspunkt. Vannet blir spredd over filtermediet i gråvannsanlegget gjennom 5 dyser. Filtermedier som blir brukt her er av typen Filtralite NR 10-20 mm (Leca Rælingen, Norge). Gråvannet renner med umettet strømming gjennom filtermediet, hvor det er dannet biofilm. Etter at vannet har passert biofilteret, blir det tatt en ny vannprøve. Vannet går videre til en ny sedimentasjonstank, som er kalt for sekundærsedimentering.

Etter dette steget vil gråvannet bli tilført til fire grøfteoppbygginger av PP-plast, gjennom en Ø6 mm PVC-slange, med fritt utløp. Det ble tatt vannprøve for ett av grøfteoppbyggingene, kalt for A2. Grøfteoppbyggingen er slik at er det tilpasset for steder der jorda har dårlig infiltrasjonsevne og terrenget er relativt flatt, slik at terrenget risikerer oppstuvning av gråvann om en ikke har dreneringsrør i bunnen av grøfta.



Figur 1 Skisse av grøfteoppbygginger. Oppbygging av filtertypene. (Reiakvam, 2016)

Det ble tatt ut prøver på de seks prøvepunkter beskrevet ovenfor i systemet, som ble fordelt på 18x2,5 mL prøveflasker.

Det totale Ag^+ innholdet i prøvene ble målt ved hjelp av Agilent 8800 ICP-MS Triple Quad Instrument (Agilent Technologies, Japan) med Ag-standardløsninger fremstilt ved fortynning av et sertifisert referansemateriale (Trace Metals- Sewage Sludge 3). 2,5 ml vannprøve ble tilsatt 2,5 ml HNO_3 , etterfulgt av mikrobølgeassistert dekomponering i UltraWAVE (Milestone Inc, USA), slik at det ikke foreligger partikler i prøvene.

For dette ble det tatt ut 2,5 ml prøve og tilsatt 2,5 ml HNO_3 , som ble satt i UltraWAVE i 60 min, med 15 min avkjøling. Referansematerialet og blanke prøver settes inn for å teste nøyaktigheten og kontaminering. Kammeret i maskinen ble fylt med 130 ml vann og 5 ml HNO_3 .

Stativet med 12 prøver ble automatisk senket inn i et mikrobølgeovnkammer. Deretter ble klemmen til kammeret sikret og satt under trykk opp til 40 bar med inerte gass, for å hindre prøven i å koke. Gassen som ble brukt til dette var nitrogengass. Det ble så tilført mikrobølgeenergi slik at alle prøvene har samme temperatur og trykk, fulgt med rask avkjøling i kammeret. Prøvene nådde en temperatur på 286°C og 154 bar på sitt høyeste.

Etter dekomponering ble prøvene fortynnet med destillert vann til 25 ml for ICP-MS bestemmelse. Prøvene ble kalibrert med tre seriefortynninger av AgNO_3 for å lage en standardkurve. Standardene hadde kjente konsentrasjoner på forholdsvis 2, 10 og 50 $\mu\text{g/L}$.

Referansematerialet hadde $128 \pm 5,56$ mg/L Ag. Prøven ble klargjort ved å måle 0,2 g av referansematerialet med en nøyaktighet på $\pm 0,001$ g, tilsatt 2,5 ml destillert vann og 2,5 ml HNO₃, deretter fortynnet 10x, til 25ml. De blanke prøvene ble klargjort ved å ha 2,5 ml destillert vann og 2,5 ml HNO₃ blandet, dermed fortynnet til 25 ml.

Til analysene av sølvpartikler ble det brukt to isotoper av sølv, Ag 109 og Ag 107. Etter hver tiende prøve ble resultatene sjekket mot In-House Standardløsning av Ag⁺ med kjent konsentrasjon, tilsatt 10% HNO₃.

Disse analysene ble gjennomført to ganger på grunn av instrumentfeil den første gangen. Det ble brukt Rhodium i begge analyserundene som online standard, og oksygen som inerte gass.

2.1.1 Tørrstoffinnhold

Hensikten med prøven er å fastslå den vannfrie andel av prøven som tas. Den vannfrie andel av prøven kan videre benyttes til analyse av organiske og uorganiske andeler. Prøvene tas av sedimentert stoff som inneholder en stor andel suspendert stoff. Bestemmelse av vanninnhold er aktuelt for alle naturlig forekommende jordarter, for steinmaterialer og for kunstig fremstilte materialer. Vanninnholdet benyttes, sammen med konsistensgrensene, for klassifisering av jordarter og beskrivelse av de geotekniske egenskapene. Prøven veies før den plasseres i et varmeskap og tørkes til konstant masse ved en temperatur av $(110 \pm 5) ^\circ\text{C}$. Etter avkjøling veies prøven.

Vanninnholdet av materialet beregnes av følgende formel i masseprosent av den tørkede prøvens masse :

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_3 - m_1} \cdot 100 \%$$

der:

w = vanninnhold i %

m_1 = masse i gram av skål

m_2 = masse i gram av skål og fuktig prøve

m_3 = masse i gram av skål og tørr prøve

For å bestemme den vannfrie andelen i selve filtermaterialet ble det tatt ut og veid prøver ved våtvekt, og satt inn i tørkeskap. Etter 24 timer ved 105°C blir det veid igjen for tørrvekt /tørrstoff. Dette er viktig for bestemmelse av organisk innhold i og på filtermaterialet, og for bestemmelse av sølvpartikkelinnhold per kg tørrvekt.

Dette ble gjort for filtermaterialet før tilsatt gråvann, etter tilsatt gråvann og etter tilsatt nanosølv ved avsluttet forsøk.

2.1.2 Totalt suspendert stoff (TSS)

Bestemmelse av SS er nødvendig for å uttrykke hvor mye løst partikulært materiale som finnes i en vannprøve. I vann som skal brukes til fisk er det uønsket med for høyt innhold av partikler. Vann fra myrområder vil lett inneholde for mye humuspartikler (organisk materiale i partikkelform). Ved lufting kan det forekomme kjemisk utfelling av for eksempel metaller som jern, og det vil bli dannet partikulært materiale (oker). Det ønskes derfor målt SS før og etter vannbehandlingstiltak, hvor det finnes normer for hva som er aksepterte kvaliteter etter behandling /utslipp. Dersom andelen av suspendert stoff er høy, sier vi at prøven har høy turbiditet. Turbiditetsmålinger kan derfor også brukes som indikator på partikkelinnhold, og er et mål på mengden finpartikulært materiale. Vannprøven «kjøres» gjennom et filter.

Sluttvekt / ant liter prøve = SS mg/l

I metoden benyttet her (Norsk Standard NS-EN 872) anvendes det et membranfilter med åpning på 0,45 µm. Partikler større enn poreåpningen vil da holdes igjen. Det kan benyttes andre filtertyper med annen størrelse på poreåpningene, avhengig av hvor fint materiale en ønsker å holde tilbake. Ved å veie filterduken før og etter filtrering, og veie vektøkningen på filterduken får vi vekten av partikler.

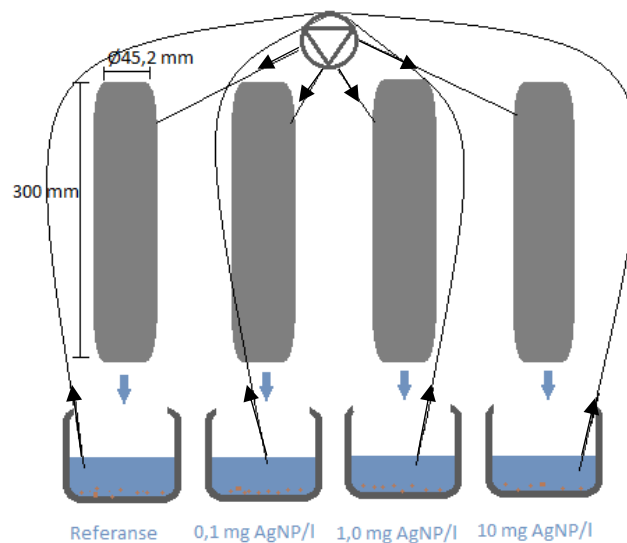
2.1.3 TEM

En liten dråpe av prøven blir plassert på kobbernett (FCF200-CU, Electron Microscopy Sciences) og settes til tørking. Etter at nettet har tørket blir den satt inn i transmisjonselektronmikroskopet, hvor det blir brukt høy-energi elektronstråle for å bombardere prøven. Avhengig av mengden energi som blir absorbert av prøven, varierer intensiteten til strålen som treffer visningsskjermen, og et bilde oppstår.

2.2 Kolonneforsøk

Fire rør med indre diameter på Ø45,2 mm og lengde på 30 cm, fylt med FiltraLite® NR 2-4 mm (Maxit Group, Norway) ble kjørt aerobt ved hjelp av peristaltisk pumpe. Filtralite® NR 2 – 4 mm er kuler med glatt overflate, laget av ekspandert leire.

Kolonnene ble plassert vertikalt i et stativ og en slange på Ø8,0 mm førte vann hentet fra dysene til Ecomotive A02 anlegg, over filtermaterialet slik at vannet spredde seg nedover og dannet biofilm.



Figur 2 Praktisk oppsett av kolonneforsøk.

Filtralite NR 2-4 mm har en tetthet på 360 kg m^{-3} , korngradering på $d_{10} = 2,2 \text{ mm}$, og graderingstall $C_u = 1,7$ [47]. Den kjemiske sammensetningen er gitt i tabell 1.

Tabell 1 Kjemisk sammensetning av Filtralite NR 2-4 mm [47].

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	K ₂ O	CaO	Na ₂ O
63 %	17 %	7 %	4 %	2 %	2 %

Før kolonnepakning ble $150 \pm 0,1 \text{ g}$ filtermateriale veid, og skylt med fullskala forbehandlet vann fra slamavskiller og sedimentert i primærsedimenteringstank i A02. Dette er vann som kommer ut av dysene videre til det biologiske trinnet i A02. Dette vannet ble brukt for å senke den initiale pH-en slik at mikroorganismene trivdes. Filtermaterialet ble inokulert ved å mette

den med biofilm hentet fra anlegget i 12 timer. Dette ble gjort ved å hente ut lettlinker fra A02 anlegget, tilsette gråvann fra dysene og riste kraftig for å løse opp biofilmen på bærematerialet. Deretter ble dette vannet tilsatt til lettlinkene som skulle brukes i kolonnene. slik at det var en startkultur som var lik med den i A02. Det var en startkonsentrasjon av organisk materiale som var lik i alle fire. Vi hadde kjent SS, KOF og BOF₅. Filtermediet ble fylt i PVC- rørene.

Kolonnene hadde en startkonsentrasjon av nanosølv som varierte bortover; høy, middels, lav og referanse.. Det ble så tilsatt nanosølv etter 12 timer med inokulering, i fire konsentrasjoner; referanse (vann fra dyse, 0,5 ug/l n=3), 0.1 mg/l, 1 mg/l og 10 mg/l.

Pumpene hadde en belastning som tilsvarte 500 L/m²/d. For arealet av kolonnene som ble brukt, tilsvarte det en belastning på 890 ml/d. For å gå til dette, ble det satt slik at den kjørte 37,2 ml/h. Pumpene ble på denne måten tidsstyrt, slik at den kjørte i pulser på 9,3 ml hver 15 minutt.

For vannanalysene ble det målt KOF totalt 6 ganger i løpet av forsøksperioden, i tillegg til startkulturen før tilsetning av nanosølv. BOF₅ ble målt tre ganger, for startkulturen, etter tilsatt nanosølv i 7 dager og 14 dager. Koliforme bakterier og *E.coli* ble målt før forsøk og etter 14 dager. Antall dyrkbare bakterier (HPC) ble målt fire ganger i vannfasen, og i biofilmen på filtermediet etter 14 dager. Det ble også målt pH for startkulturen og etter 14 dager.

KOF-analyse ved hjelp av HachLange-metoden

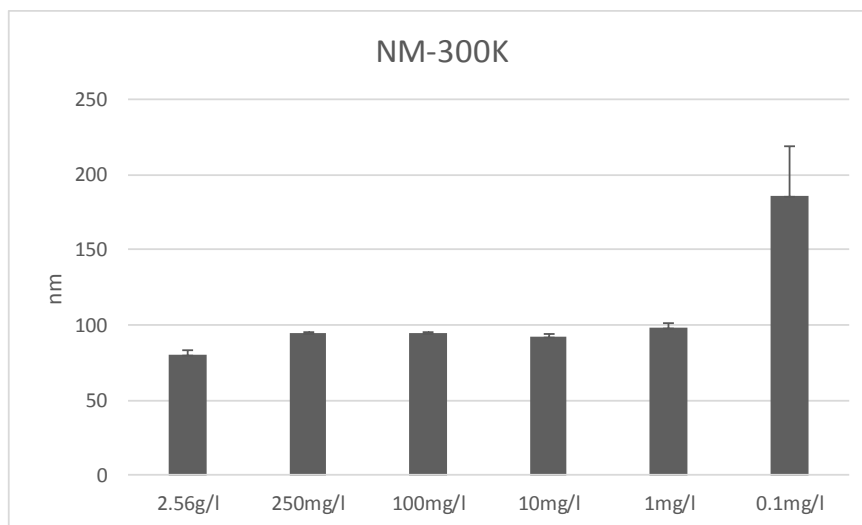
COD (Chemical Oxygen Demand) er mengden organisk materiale som oksideres av $K_2Cr_2O_7$ (kaliumdikromat). Det kjemiske oksygenforbruket kan bestemmes vha. to metoder, enten ved en oksydasjon med kaliumpermanganat ($KMnO_4$), COD_{Mn} eller ved en oksydasjon med kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$), COD_{Cr} . Kaliumdikromat er et sterkere oksydasjonsmiddel enn kaliumpermanganat, og COD_{Cr} er som regel høyere enn COD_{Mn} hvis begge metodene brukes på det samme vannet. Dikromatmetoden splitter, i motsetning til permanganatmetoden, også opp mesteparten av det partikulære organiske materiale i vannet. Dikromatmetoden brukes derfor som regel på avløpsvann, mens permanganatmetoden fortrinnsvis brukes på vann med lavt partikkelinnhold (drikkevann).

Beskrivelse av fremgangsmåten av COD-analyse framgår slik; reagensene fås i suspensjon. Pipetterer 2 ml prøve over til kyvetten, setter på lokk og tørker godt på utsiden. Kyvetten snus og settes ved 148C i to timer. Etter dette inverteres den to ganger for så å settes til avkjøling, for så og tørkes godt av igjen og leses av.

2.2.1 Tilsetting av AgNP

Nanosølv av typen NM-300K med konsentrasjoner på 0,1 mg/l, 1 mg/l og 10 mg/l ble tilført i gråvannet etter 12 timer inokulasjon. Hver av dispersjonene hadde volum på 1,5 liter.

Dispersjoner av NM-300K ble gjort etter SOP-metoden (Standard Operating Procedure) [48]. NM-300K har et sølvinnhold på 10,16%. Dispersjoner ble laget ved å veie 2,16 g med sølvdispersjon, og tilsatt 10 ml med destillert vann for å få 2,52 mg/l AgNP/l. 3,9 ml av dette ble blandet ut med 1000 ml vann for å få 10 mg/l. 4 ml av dette igjen ble blandet ut med 1000 ml for å få 1 mg/l, og 0,4 ml ble blandet ut med 1000 ml vann for å få 0,1 mg/l.



Figur 3 Størrelse i nanometer på nanopartikler ved de ulike fortynninger av NM-300K, med standardavvik. Utført med Malvern PN3702 Zetasizer.

2.2.2 Heterotrophic plate count (HPC)

Til kvantifisering av bakterier har det vært brukt platespredning. Dette gjøres ved at et bestemt volum (100 µl) av en kjent fortynning strykes på overflaten av en agarskål. Etter inkubering telles kolonier på overflaten av agarskålen og antall CFU (colony forming units) i den opprinnelige prøven kan beregnes. Ved utstryking av prøve på en agar testes et volum på 100 µl, og negative funn blir presentert som >10 CFU/ml. Er bakterietallet svært lavt blir prøvene usikre. Det ble brukt flytende KPG-agar for utstøping av agarskålene.

Det ble startet med å lage fortynninger av vannprøvene før platespredningen. Fortynningsflaskene inneholdt 9 ml sterilt vann. Det ble startet med å lage 1:10 fortynning (1 ml prøve+ 9 ml vann), så ble 1 ml av denne fortynningen videre fortynnet til 1:100 og fortsatte til ønsket fortynning, som var 1:1000 000. Blandingene ble ristet godt mellom hver fortynning.

For selve platespredningen ble fortynningsflaskene igjen ristet godt før uttak. 100 µl ble tatt ut med automatpipette og satt av på agaroverflaten. En glasstav (Drigalski-spatel) ble sterilisert ved å dryppe den i 96% etanol og deretter antenne den i gassflamme. Staven ble tatt raskt ut av flammen og avkjølt på agaroverflaten, utenfor dråpene. Dette for å hindre at mikroorganismene får sjokk av varmen. Prøvene ble strøket med en lett hånd utover agaroverflaten med den sterile glasstaven, og fordelt jevnt til det meste ble absorbert i agaren. Platene ble så inkubert for alle forsøkene 4 dager ved 22C. CFU/ml vannprøve ble regnet ut.

;

2.2.3 Analysemetoder for *Escherichia coli* (*E.coli*) og koliforme bakterier (KB)

En hurtig metode for påvisning og telling av *E. coli* og KB er Colilert 18/Quanti-Trays2000 Method (IDEXX). Ved bruk av denne metoden skal prøvene avleses etter 18 timer. Prinsippet baserer seg på at det undersøkes for aktiviteten til enzymet β -D galaktosidase (GAD) [49].

Den amerikanske produsenten (IDEXX) av Colilert – 18 anviser en inkuberingstemperatur på $35 \pm 0,5$ °C og en inkuberingstid på 18 – 22 timer. Historisk sett har det etablert seg en forskjellig praksis mellom USA og Europa når det gjelder inkuberingstemperatur ved bestemmelse av koliforme bakterier. Mens det i USA er vanlig å inkubere ved 35 °C benyttes 37 °C i Europa [50] .

Det benyttes brett som er inndelt i 97 brønner i to forskjellige størrelser. 100 ml prøve fordeles på disse brønnene og brettet forsegles før inkubering. Prøvene blir hentet fra ulike tidspunkt i prosessen i de forskjellige kolonnene. På laben fortynnes disse prøvene. Colilert metoden benytter en tabell for å lese av antall indikatorbakterier. Den første prøven ble fortynnet til 1:100 000. Det ble startet med å lage 1:10 fortynning (1 ml prøve+ 9 ml vann), så ble 1 ml av denne fortynningen videre fortynnet til 1:100 og fortsatte til ønsket fortynning, som var 1:100 000. Blandingene ble ristet godt mellom hver fortynning, helt direkte i 100 ml steril flaske og blandet ut med Colilert pulveret slik standardprosedyren er. Ferdigblandet ble prøvene helt over i *Quanti Trays*, merket og forseglet i *Quanti Tray Sealer*. Så blir de lagt til inkubasjon i 18-22 timer på rundt $37 \pm 0,5$ grader,

Colilert – 18 metoden benyttes til å kartlegge både koliforme bakterier og *E.coli*. Analysen av koliforme bakterier går ut på at man leser av antall gule «store» og «små» lommer på *Quanti tray* og bruker dette til å lese av verdi på tabellen. Verdien blir så multiplisert med fortynningsforholdet. Analysen av *E.coli* foregår på samme måte, men her benytter man UV lys og leser av de lommene som er fluorescente og sender ut en blålig farge.

Prøveresultatene blir oppgitt i MPN/100 ml. MPN (most probable number) er en kvantitativ metode som har større usikkerheter enn platespredning.

2.2.4 Kvantifisering av Ag⁺ i filtermateriale

For bestemmelse av Ag⁺ som ble tatt opp i filtermaterialet etter endt forsøk, ble prøvene tørket (2.2.1), knust og tilsatt 5 ml salpetersyre (HNO₃) og 1,5 ml saltsyre (HCl). Deretter ble prøvene dekomponert i UltraWAVE (Milestone Inc, USA) og konsentrasjonene bestemt med Agilent 8800 ICP-MS Triple Quad Instrument (Agilent Technologies, Japan) sammen med de andre prøvene i vannfasen. Prøvene ble fortynnet til 50 ml, så tatt 1 ml av denne og fortynnet enda en gang til 50 ml. Dette for å hindre at det tetter igjen ICP-MS instrumentet.

Det samme ble gjort for filtermaterialet før forsøk, for å se om det eventuelt inneholdt sølv som kunne lekke ut eller gi feilutslag på bestemmelse av hvor mye som er tatt opp.



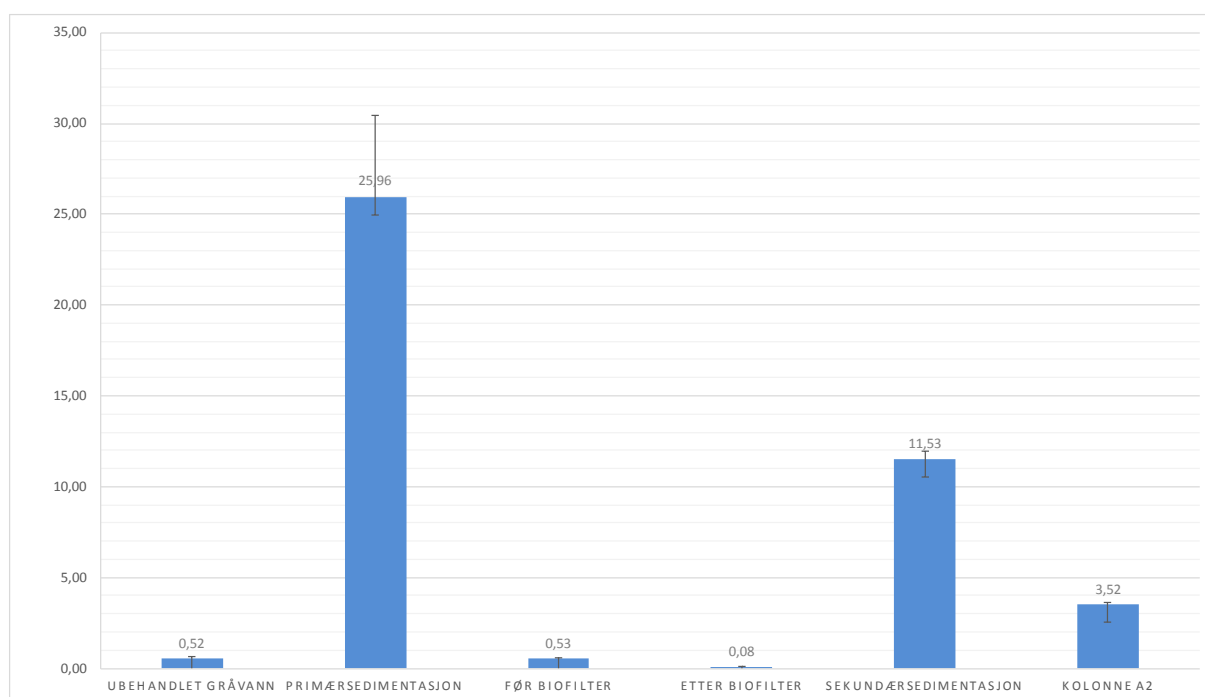
Figur 4 Bildet viser det knuste filtermaterialet, før tilsetning av HNO₃ og HCl.

3 Resultater og diskusjon

3.1 Konsentrasjoner av sølv påvist i avløpssystemet

Resultater på analysene av Ag i avløpssystemet er vist i figur 6 og data er vist i vedlegg A. Resultater på isotop 107 og 109 er omtrent likeverdige, og det er valgt å gå videre med resultater på isotop Ag 107, da det må velges ut hvilke type en skal bruke. Data ligger vedlagt i Vedlegg B.

Prøvene bestod av fortyninger på 10^{-1} . Tabellen nedenfor viser påviste virkelige konsentrasjoner funnet ved ICP-MS Triple Quad Instrument, med en deteksjonsgrense (LOD) på $0,0116 \mu\text{g/L}$, og kvantifiseringsgrense (LOQ) på $0,0386 \mu\text{g/L}$.



Figur 5 Gjennomsnittlig konsentrasjon av Ag (isotop 107) på alle prøvetakingspunkter i gråvannssystemet. Alle konsentrasjoner er oppgitt i $\mu\text{g/L}$. $n=3$

Resultater av konsentrasjoner av sølvpartikler fra det naturbaserte avløpssystemet viste helt klare konsentrasjoner og overganger fra de forskjellige delene i systemet. Prøven som er hentet fra ståltanken hadde gjennomsnittlig konsentrasjon på $0,52 \mu\text{g/L}$. Neste prøvepunkt, i sedimenteringstanken før biofilter, hadde en gjennomsnittlig konsentrasjon på $25,96 \mu\text{g/L}$. Det ble påvist størst konsentrasjon i den første sedimentasjonstanken. Dette styrker teorien om at 80-

100% av sølvet blir bundet til slammet i avløpssystemet. Gråvannet som går gjennom dysene til biofilteret hadde 0,53 µg/L partikkelinnhold av sølv, og etter filtrering gjennom biofilter så lite som 0,08 µg/l. Slammet fra sekundærsedimenteringen hadde en konsentrasjon på 11,53 µg/L.

Slammet fra primærsedimentasjonstanken hadde en konsentrasjon på 0,00083 mg Ag⁺/kg tørrstoff. Sekundærsedimentasjonstanken hadde konsentrasjon på 0,00025 mg Ag⁺/kg tørrstoff.

Når slammet har sedimentert, faller partiklene til bunns og slamvannet går i overløp videre til filtreringskolonner. Det har blitt tatt prøve på kolonne A2. Her er det påvist en gjennomsnittlig konsentrasjon på 3,52 µg/l. Det er mistanke om at det høye innholdet av sølvpartikler i filtermaterialet kan forårsake denne utlekkingen. Partikkelinnholdet av sølv i filtreringsmaterialet brukt i gråvannstanken er 0,11 mg/kg tørrstoff (Gjengedal, 2017).

Resultatene fra prøvene viser at sedimentering er effektiv for fjerning av sølvpartikler i avløpsvann. Klarer avløpsrenseanlegget å fjerne mest mulig partikler, slik at vi har mindre turbid avløpsvann som går gjennom biofilteret, er det grunn til å tro at renseseffekten blir økt med hensyn på flere parametere.

3.1.1 Tørrstoffinnhold

Tabellen nedenfor viser målinger som benyttes i beregninger videre for tørrstoffinnhold, etter 24 timer i tørkeskap.

Tabell 2 Vekt av prøvene før og etter tørkeskap

	Beger	Beger + vannprøve	Beger + tørr prøve	% w
(1) Primærsedimentering	26,4198 g	46,6177 g	26,5443 g	161,2 g
(2) Sekundærsedimentering	28,4009 g	48,5553 g	28,4872 g	232,5 g
(3) Referanse	38,133 g	40,113 g	38,134 g	1979
(4) 0,1 mg AgNP/l	15,706 g	17,686 g	15,709 g	659
(5) 1,0 mg AgNP/l	15,481 g	17,462 g	15,484 g	659
(6) 10 mg AgNP/l	24,196 g	26,201 g	24,202 g	333,2
(7) Referanse, filter	1,858 g	3,996 g	3,417 g	0,4
(8) 0,1 mg AgNP/l, filter	1,851 g	3,989 g	3,389 g	0,4
(9) 1,0 mg AgNP/l, filter	1,881 g	4,005 g	3,406 g	0,4
(10) 10 mg AgNP/l, filter	1,871 g	4,036 g	3,443 g	0,4
(11) Referanse start	38,135 g	40,168 g	38,136 g	1016
(12) Referanse slutt	15,717 g	17,707 g	15,719 g	497
(13) 0,1 mg AgNP/l slutt	24,199 g	26,213 g	24,195 g	1,5
(14) 1,0 mg AgNP/l slutt	14,752 g	16,697 g	14,757 g	388
(15) 10 mg AgNP/l slutt	15,483 g	17,507 g	15,484 g	2023

3.1.2 Totalt suspendert stoff

Tabellen nedenfor viser målinger som benyttes i beregninger videre for totalt suspendert stoff, etter 24 timer i tørkeskap.

Tabell 3 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra primærsedimentering (1)

	Beger + Filter	Fyll	TSS
Før	2,0928 g	10 ml	
Etter	2,1525 g	10 ml	5,97

Tabell 4 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra sedimentærsedimentering (2)

	Beger + Filter	Fyll	TSS
Før	2,1390 g	10 ml	
Etter	2,1799 g	10 ml	4,09

Tabell 5 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Startverdi for alle kolonner.

	Beger + Filter	Fyll	TSS
Før	2,075 g	10 ml	
Etter	2,077 g	10 ml	0,02

Tabell 6 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra referansekolonnen (3)

	Beger + Filter	Fyll	TSS
Før	2,056 g	10 ml	
Etter	2,059 g	10 ml	0,03

Tabell 7 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra kolonne med lav konsentrasjon av Ag (4)

	Beger + Filter	Fyll	TSS
Før	2,082 g	10 ml	
Etter	2,086 g	10 ml	0,04

Tabell 8 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra kolonne med middels konsentrasjon av Ag (5)

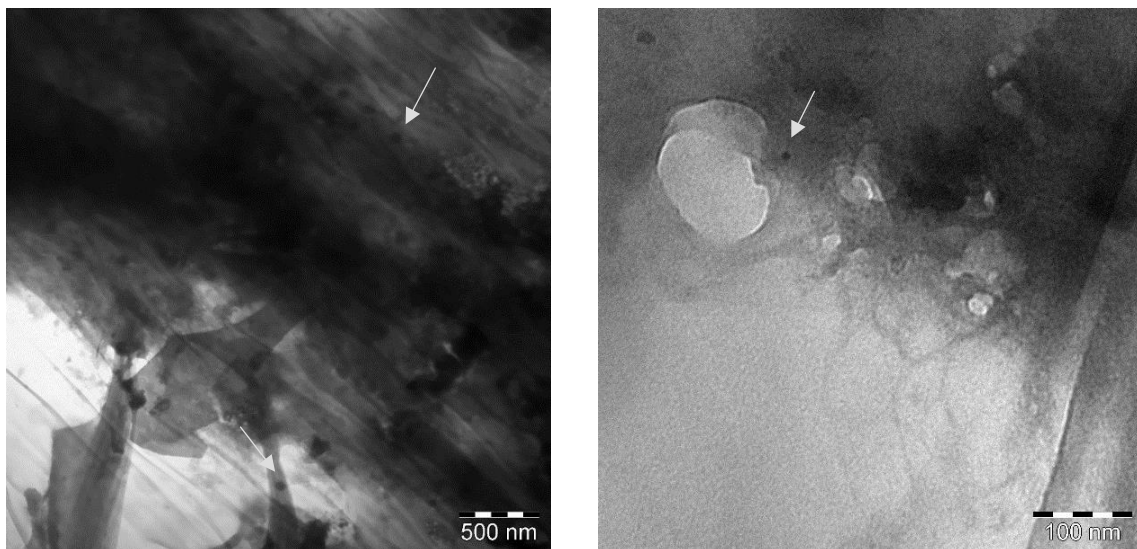
	Beger + Filter	Fyll	TSS
Før	2,062 g	10 ml	
Etter	2,065 g	10 ml	0,03

Tabell 9 Vekt av slam og beger med filter, før og etter tørkeskap. Fra kolonne med høy konsentrasjon av Ag (6)

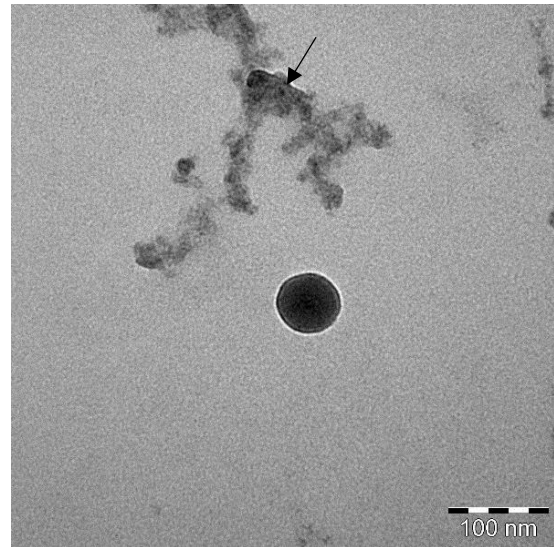
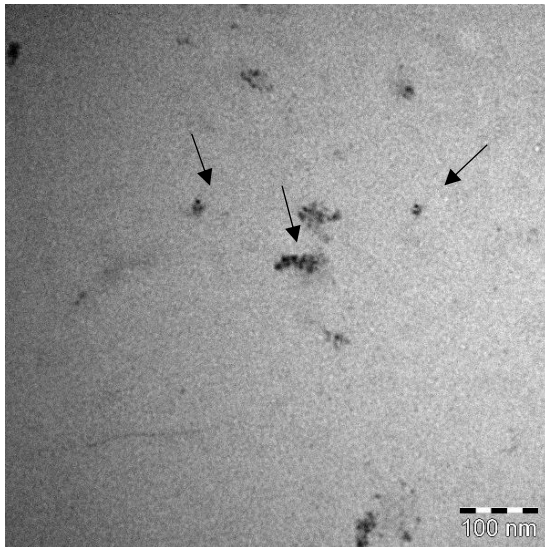
Før	2,076 g	10 ml	
Etter	2,079 g	10 ml	0,04

3.1.3 Transmisjonselektronmikroskop (TEM)

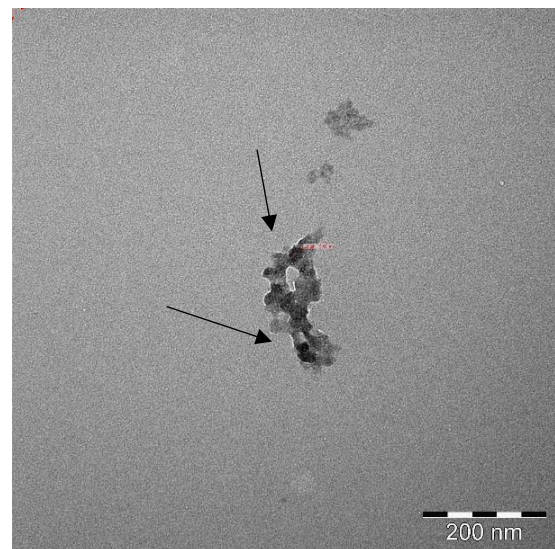
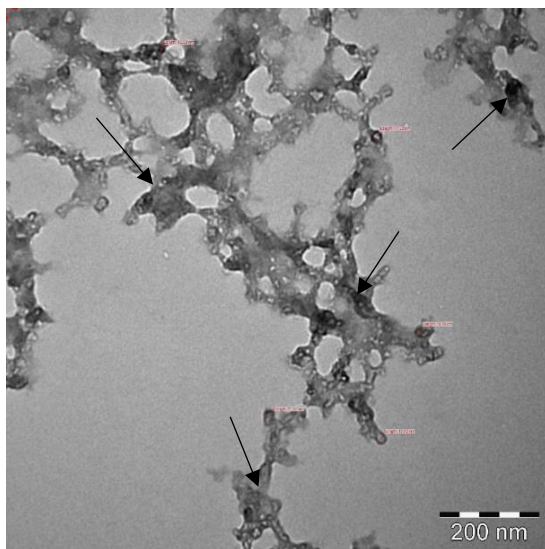
I bildene nedenfor kan en se nanopartikler tatt med transmisjonselektronmikroskop. Dette viser ikke om nanopartiklene vi ser er av sølvpartikler, men det er med stor sannsynlighet da alle disse vannprøvene hadde konsentrasjoner av sølvpartikler. Det er tegnet inn piler på nanopartikler på bildene. Sølvpartikler har lett for å aggregere seg sammen og danne grupper, ofte funnet bundet til andre partikler. Det var ingen slike partikler å finne i supernatanten til slamprøvene. Det er derfor prøvene med minst partikler hadde minst konsentrasjon av sølvpartikler.



Figur 6 TEM bilde av nanopartikler i prøve tatt fra slamvann fra sekundærsedimentering. Skala er 500 nm (v) med synlige partikler på ca. 100 nm, og 100 nm (h) med minste synlige partikler på 10-20 nm.



Figur 7 TEM bilde av nanopartikler i prøve tatt fra slamvann etter primærsedimentering. Skala er 100 nm. De minste synlige partikler her er <10 nm.



Figur 8 TEM bilde av nanopartikler i prøve tatt fra ubehandlet gråvann. Skala er 200 nm. Det er nanopartikler i størrelsesorden 10-20 nm.

3.2 Eksponering av nanosølv (Ag-NP) til kolonneforsøk

Den første utfordringen med å dette forsøket var å få til 1/50 forhold på filtermedie og kolonne areal, for å unngå veggeffekter. Det var i utgangspunktet tenkt å kjøre kolonne med 10-20 mm kuler for å ha lik størrelse og materiale som i det biologiske gråvannsanlegget A02. Med hensyn på materiale som var tilgjengelig, ble dette ble vanskelig å få til. Kornene ville legge seg forskjellig avhengig av om det var i midten av røret eller i ytterpunktene. Det ville vært et parti som var ordnet i midten, og et parti som hadde hindret plassering mot veggen, slik at det ikke hadde blitt den samme tette kulepakningen i hele røret, slik det var ønskelig å få til. I ytterpunktene ville det blitt et område som var litt mer porøst enn i midten. Dette betydde at størrelsen måtte opp på kolonnene, og ned på filtermediet.

Neste utfordring var hvordan vannet skulle tilføres kolonnene. Når vannet slippes i senter av kolonnen, er det med stor sannsynlighet at vannet kun passerer i senter av kolonnen hele veien gjennom filtermediet. Det beste hadde vært om vannet kunne blitt tilført gjennom dyser som spredte vannet over filtermediet, slik at det fikk en jevn fordeling gjennom hele kolonnen. Igjen, med hensyn til materialer ble ikke dette gjort. Det ble isteden benyttet en slange som ble plassert i midten. Det så ut til at selv med en slange på toppen i senter, klarte vannet å spre seg mye, da det ble observert vann ut av flere hull ved utløpet.

Et alternativ som ble vurdert var å fylle kolonnen helt til vannet fyller alle porer, for så å tappes når alt filtermaterialet var dekket. Den skulle så fylles opp og tappes igjen kontinuerlig, til det ble dannet biofilm. Systemet hadde blitt bygget opp slik at vannet hadde blitt løftet opp ved hjelp av nivå- eller tidsstyrt pumpe, og stengt med en ventil slik at vannet hadde blitt sluppet etter at det hadde fylt igjen alle hulrom med vann. Dette kunne blitt gjort med grovt materiale i et rør som ikke tilfredsstilte 1/50 kravet. Dette fordi når kolonnen ble fylt, vil alle overflater være i kontakt med vannet. Og siden det trekkes luft ned i systemet så hadde det fortsatt vært et aerobt system. For å vite hvor stort biofilmareal det ble totalt sett, kunne det sorteres slik at varene hadde lik kornstørrelse på alt sammen, eller telle opp hvor mange korn det er i kolonnen. Dette ville vært en vekselvis aerob/anaerobt system.

Det ble bestemt å bruke redusert kornstørrelse, men med samme materiale. 2-4 mm kuler var tilgjengelig, derfor ble denne alternative kornstørrelsen brukt istedenfor 10-20 mm kuler. Med dette ble det mulig å kjøre en slange på toppen gjennom et forholdsvis tynt rør, og få biofilm som spredde seg nedover.

Av hensyn til materialer og tid, ble dette alternativet valgt for eksperimentet. Vannet ble sluppet i midten av kolonnene gjennom en tynn slange. Slangen i beholderen ble satt slik at den ikke pumpet med seg partikler. Partiklene fikk sedimentere i beholderen.

Vannet i beholderen hadde en temperatur på 18-20°C gjennom hele perioden. Dette var en gunstig temperatur for mikrobiell aktivitet.

Forsøket ble kjørt to ganger. Den første gangen var det problem med pumpene som kjørte kontinuerlig. Det ga mange ganger større belastning på kolonnene og utgjorde en fare for å skylle vekk det som var av biofilm, eller eventuelt dannelsen av biofilm. I tillegg var det tvil om nanosølvet hadde blitt laget på en standard metode. Dermed ble hele forsøket bygget en gang til. Denne gangen med en pumpe som var tidsstyrt, slik at det ga ønsket belastning, og nanosølv som var laget etter en standard metode (SOP).

Den største utfordringen for syntese av nanomaterialer er kontroll av de fysiske egenskaper, slik som å oppnå jevn størrelsesfordeling på partiklene, identisk form, morfologi, kjemisk sammensetning og krystallstruktur. Det finnes et stort antall av syntesemetoder for nanosølv som er lett tilgjengelig i litteraturen. SOP metoden (*Standard operating procedure*) ble brukt. Dette fordi det er en egnet metode for produserte nanomaterialer som skal brukes i økotoksisitetstester.

Et av de kritiske aspektene ved bruk av denne protokollen er tidsforsinkelsen mellom forberedelse av dispersjonene, og administrasjon til testsystemet. Det er anbefalt å jobbe så fort som mulig for å unngå bivirkninger, slik som forandringer i partikkelform og hydrokjemiske reaktiviteter eller radikale dannelser som kan påvirke de økotoksikologiske effektene.

Derfor anbefales det alltid å bruke dispersjonen så snart som mulig (innen 30 til 60 minutter) og å agitere dispersjonen umiddelbart før bruk for å ha riktig partikkeldose og fraksjon. Dette er for å sikre at delprøven inneholder den tilsiktede partikkelkonsentrasjon og størrelsesfordeling. Prøvene som ble laget ble satt i systemet etter omtrent 45 minutter.

Nanopartiklene kan oksidere til Ag ioner og reagere til Ag₂S, AgCl eller andre komponenter, avhengig av hvilke andre stoffer det er i løsningen. Nanopartikler av sølv har også en tendens til å absorbere seg på overflater. I tillegg er nanosølv veldig lyssensitiv, slik at den måtte gjennom hele eksperimentet beskyttes mot direkte sol og lys. Dette ble gjort med en tilnærming å beskytte dem med aluminiumsfolie rundt og over alle beholderne.

Som forberedelse for målinger av konsentrasjon av Ag, ble prøvene tilsatt salpetersyre (HNO_3) for å fjerne organisk materiale i prøvene. Dette er en sterk syre og oksidasjonsmiddel. For å løse opp sølvpartiklene fra filtermateriale, ble den tilsatt både salpetersyre og saltsyre (HCl).

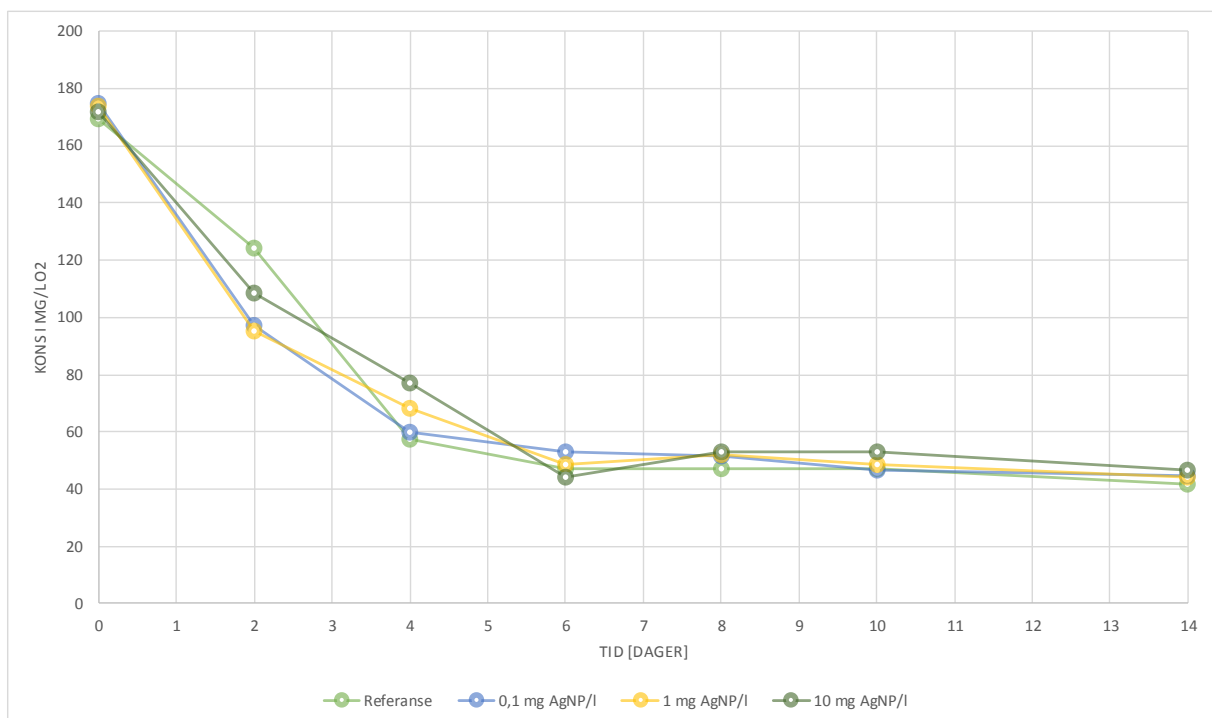
Renseeffekten til filteret ble målt ved direkte og indirekte parametere ved forskjellige konsentrasjoner av nanosølv. De indirekte parameterne på biologisk aktivitet var kjemisk oksygenforbruk og biologisk oksygenforbruk. Direkte parametere på biologisk aktivitet var renseeffekten med hensyn på *E.coli* og KB og antall dyrkbare bakterier. I tillegg med det gjort målinger på tørrstoff, suspendert stoff og pH.

3.2.1 Kjemisk oksygenforbruk (KOF) og biologisk oksygenforbruk (BOF₅)

Det ble tatt ut totalt sju prøver for KOF og tre prøver for BOF₅. Første prøve for KOF ga et utslag som var over grenseverdien med det som var angitt, dermed måtte prøvene kjøres på nytt. Resultatene er vist grafisk for de forskjellige kolonnene i figur 11 og 12.

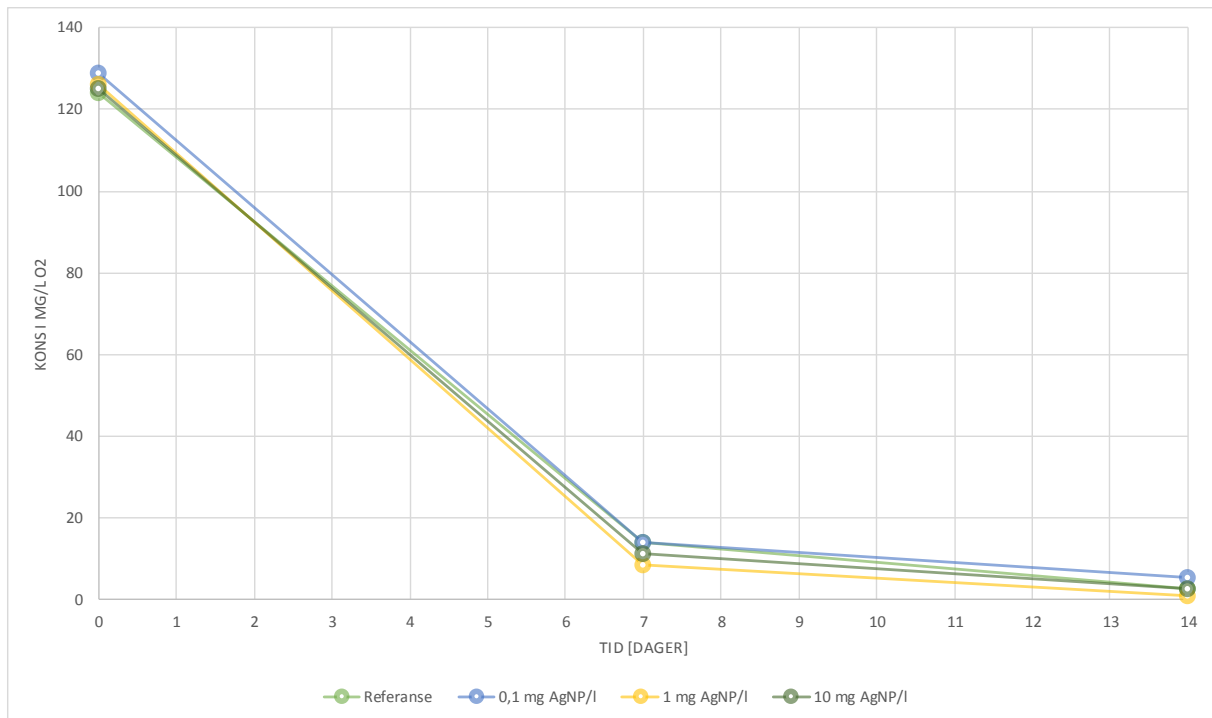
Både BOF₅ og KOF er indirekte parametere på biologisk aktivitet i kolonnene. Disse måles for å undersøke hvor mye oksygen vannet har kapasitet til å forbruke. Det er ønskelig med minst mulig av disse, da det kan føre til oksygenmangel i naturen ved høye verdier, samt forråtnelse og luktproblemer.

Når det gjelder KOF, som er et mål på både kjemisk og biologisk nedbrytbart materiale, er det lik renseseffekt i alle kolonner. Grafen stabiliserer seg underveis. Det er omtrent ~40 mg/l O₂ i prøvene etter 14 dager. Dette som er igjen kan være av tungt partikulært materiale, det vil si ikke raskt nedbrytbart materiale. Det ble likevel oppnådd en reduksjon på omtrent 70% i alle kolonner, ved å la vannet sirkulere i 14 dager. Nanosølv, selv ved ekstremt høye konsentrasjoner (verste scenario) hadde ikke påvirkning på renseseffekten til filtermediet.



Figur 9 Kjemisk oksygenforbruk i vannanalysene. De forskjellige fargekodene beskriver hvilken kolonne grafen gjelder for.

BOF₅ derimot er et kun et mål på biologisk nedbrytbart materiale. Kolonnene oppnådde alle en reduksjon på ~90% etter allerede 7 dager, og hele 99% for kolonnen med 1,0 mg Ag-NP/l etter 14 dager.



Figur 10 Biologisk oksygenforbruk (BOF₅) i vannanalysene. De forskjellige fargekodene beskriver hvilken kolonne grafen gjelder for.

Sammenhengen mellom BOF₅ og KOF kan estimeres å være slik for kommunalt avløpsvann [20]:

$$KOF = 2,15 * BOF_5 + 50$$

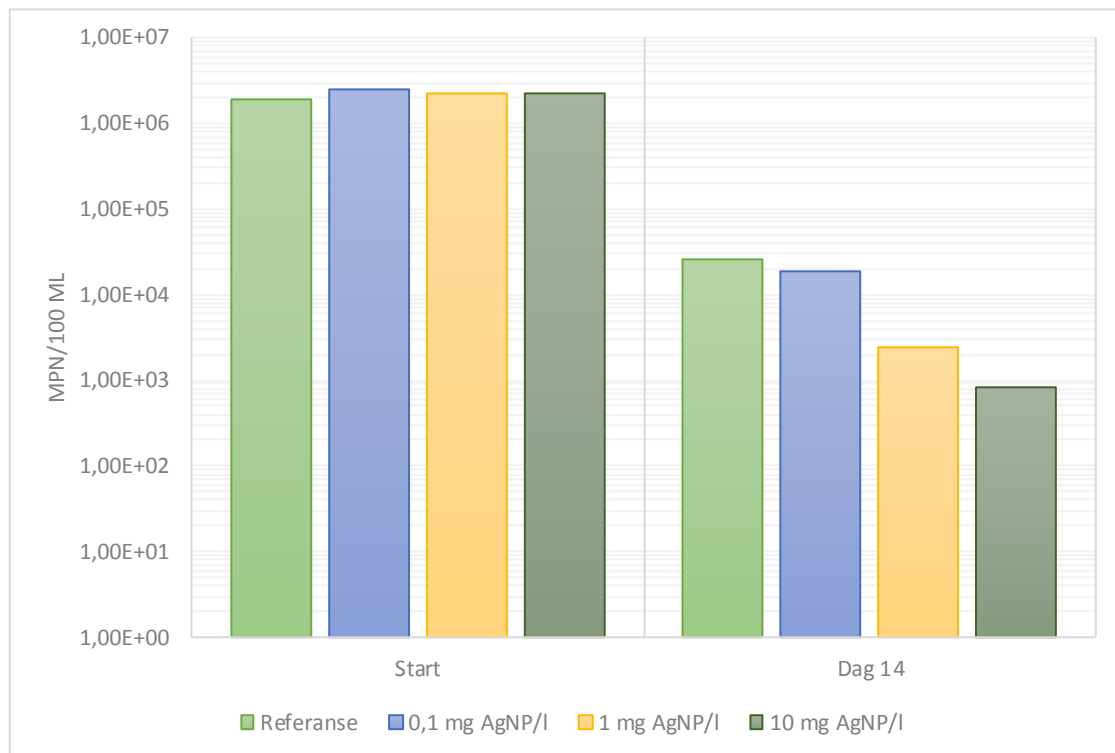
Det betyr at selv om en ikke får utslag for BOF₅ kan en få utslag for KOF. I denne sammenhengen var forholdstallet mye mindre enn dette, mulig fordi vannet som ble samlet hadde gått blitt både gått gjennom slamavskiller og sedimentering. Startverdien for KOF var gjennomsnittlig 172.5 mg/l O₂ (n=4), mens BOF₅ verdien var 126 mg/l O₂ (n=4).

3.2.2 Koliforme bakterier (KB) og *Escherichia coli* (*E.coli*)

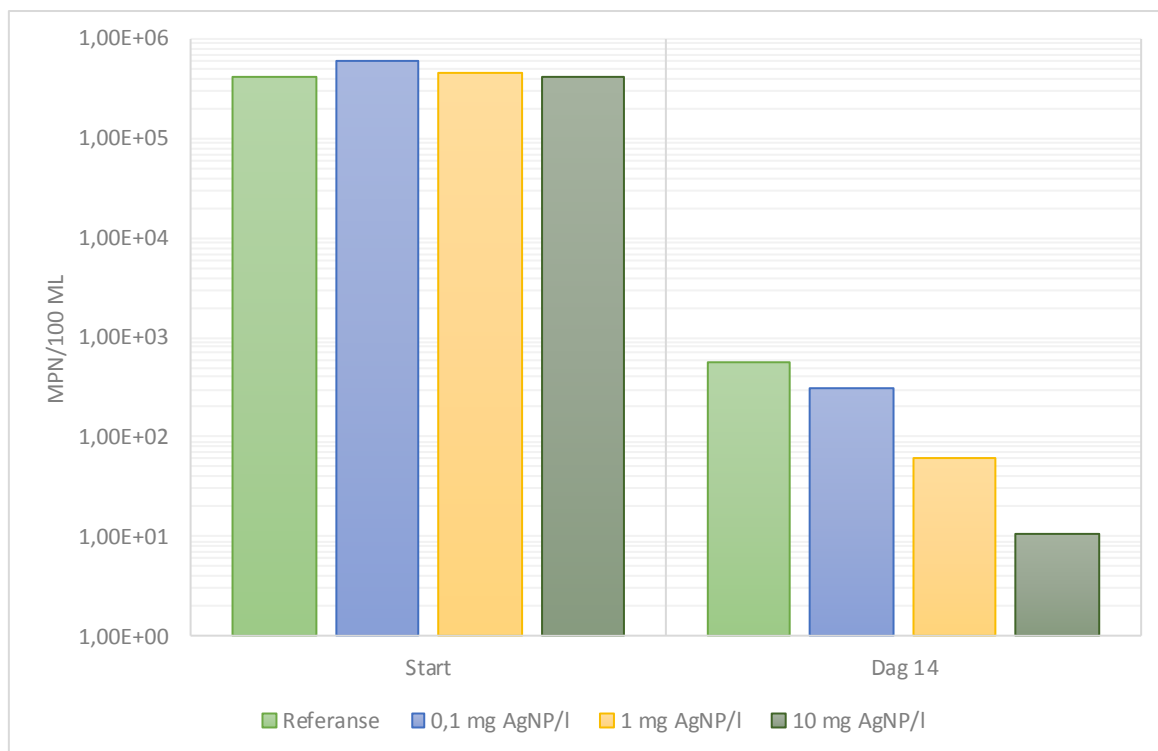
Prøver fra vannet i beholderen til kolonnene ble analysert for koliforme bakterier og *E. coli*. Figurene nedenfor viser grafisk start- og sluttkonsentrasjonen av de analyserte parameterne i en tidsperiode på 14 dager. Log₁₀ reduksjonen er gitt i tabell 9 for hver av kolonnene.

Mengden *E.coli* og KB viste større forskjeller med tiden. Noe av reduksjonen kan skyldes inaktivering eller mangel på næring slik at de dør ut med tiden. Det viser seg spesielt på BOF₅ verdiene da det ble meget stor reduksjon av oksygenforbruk i vannet etter 14 dager. Det er reduksjon som gradvis ble mer, jo høyere konsentrasjon av nanosølv det var tilsatt i systemet. Reduksjonen av BOF₅ derimot avhenger ikke av konsentrasjonen til nanosølv.

De antibakterielle egenskapene til nanosølv fungerer godt i vannfasen. Hvis det er slik at nanosølv ved så høye konsentrasjoner kan bidra med reduksjon av parametere som er ønskelig å redusere, samtidig som det ikke har påvirkning på selve renseanlegget, går den potensielle virkningen i positiv retning.



Figur 11 Totale antall koliforme bakterier per 100 ml i vannprøver ved start og etter 14 dager.



Figur 12 Antall *E.coli* per 100 ml vannprøve ved start og etter 14 dager.

Tilstedeværelsen av nanosølv bidro med 3,31 til 4,59 \log_{10} reduksjon av *E.coli*, ved forholdvis konsentrasjoner 0,1 til 10 mg Ag/l. Det bidro også med 1,86 til 3,44 \log_{10} reduksjon av koliforme bakterier. Til sammenligning er det 2,85 og 1,87 \log_{10} reduksjon for referansesystemet som ikke var tilsatt nanosølv.

Tabell 10 \log_{10} reduksjon av *E.coli* og koliforme bakterier løpet av prøveperioden-

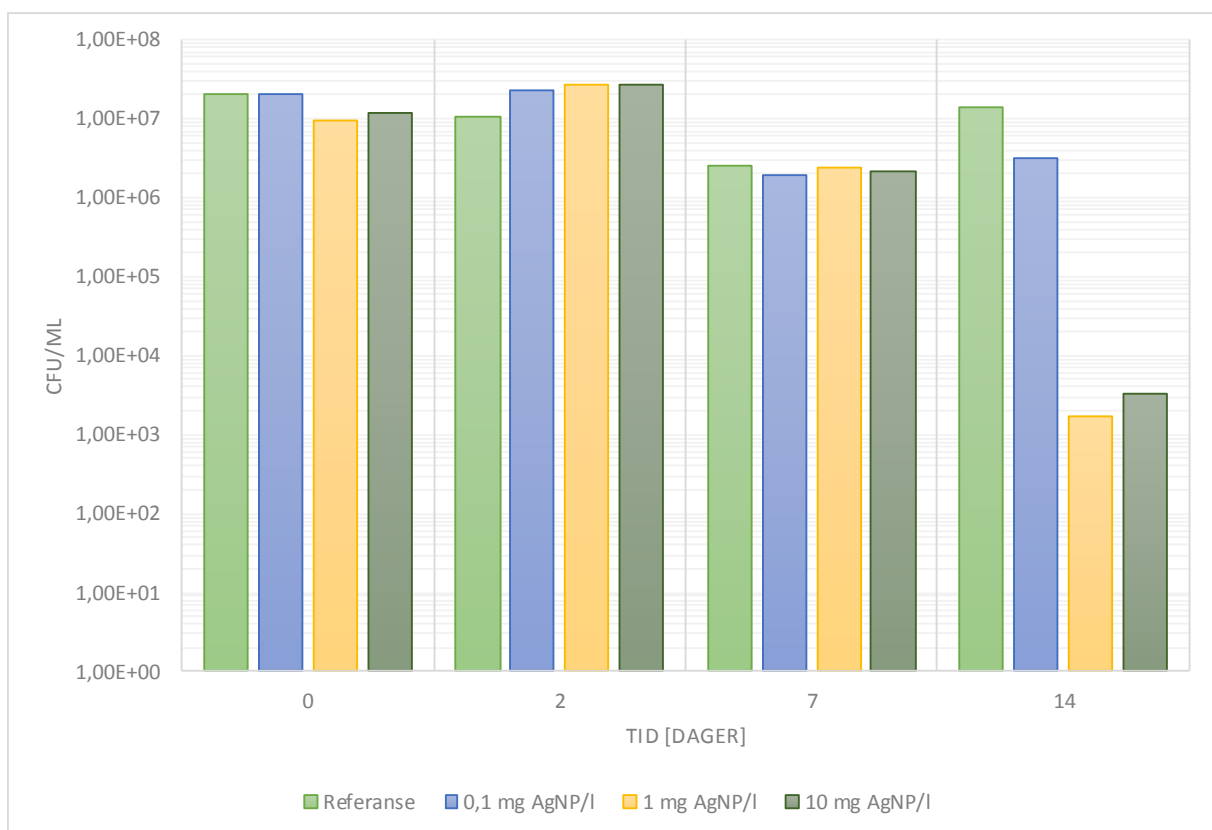
	<i>E.coli</i>	Koliforme bakterier
Referanse	2,85	1,87
0,1 mg AgNP/l	3,31	2,13
1,0 mg AgNP/l	3,89	2,96
10 mg AgNP/l	4,59	3,44

3.2.3 Heterotrophic plate count (HPC)

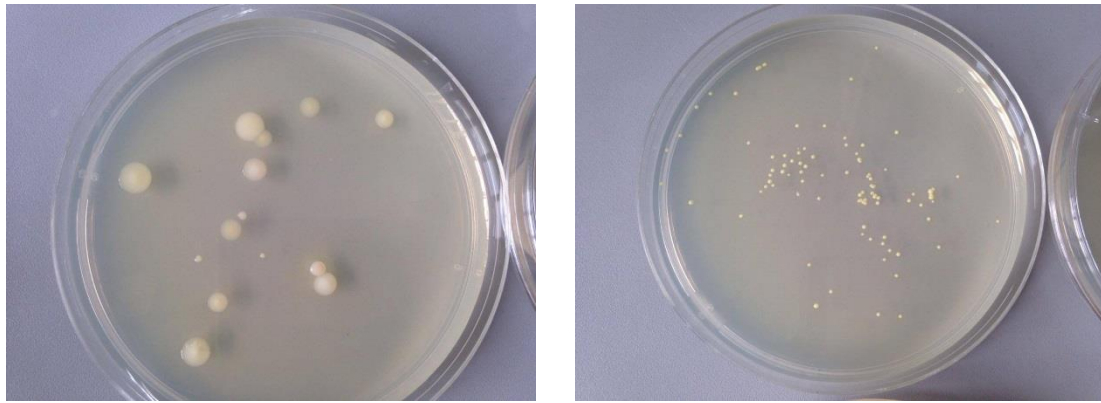
Det ble tatt prøver med platespredning på fire forskjellige tidspunkt i prøveperioden. Resultater for antallet dyrkbare bakterier i vannfasene med platespredningsteknikk, angitt CFU/ml.

Etter 7 dager var det få kolonier ved en fortykning på 10^{-6} , prøvene ble derfor fortennet kun opp til 10^{-5} ved siste måling for vannfasen.

Målinger er gjort etter 4 dager for hver av prøvene. Det var flere kolonier som dukket opp etter som tiden gikk, men disse er ikke tatt hensyn til.

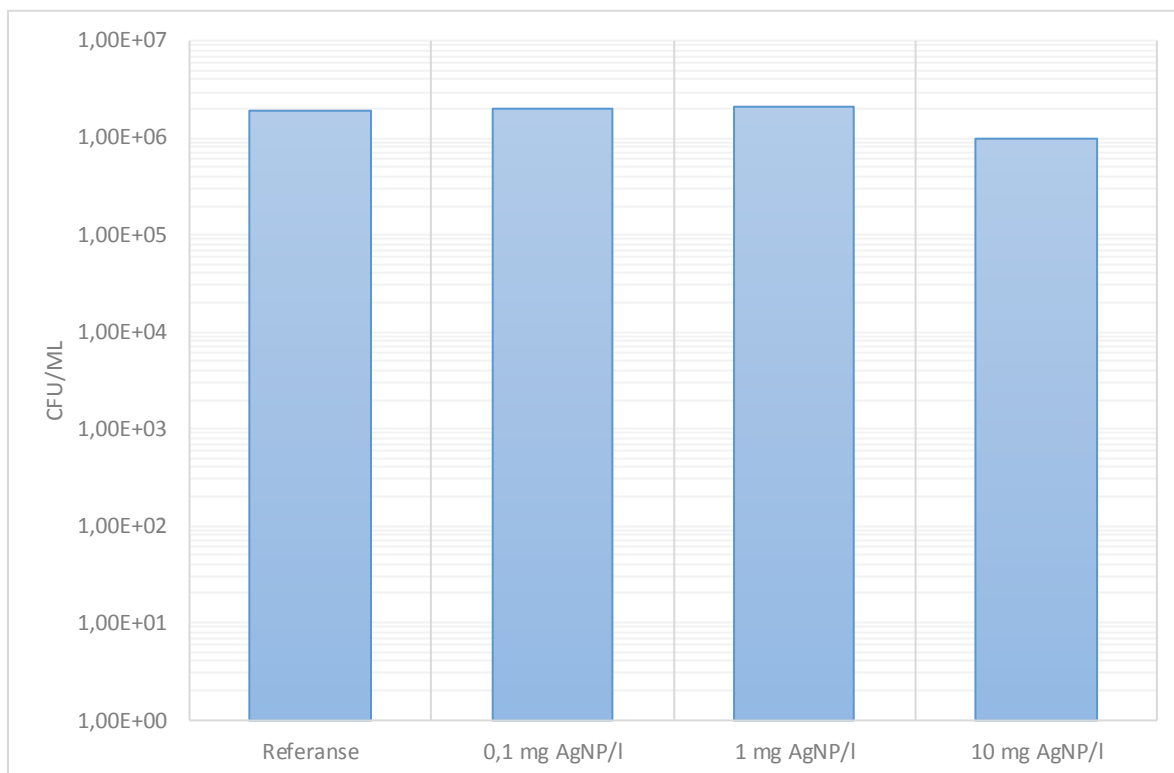


Figur 13 Antall dyrkbare bakterier målt i CFU/ml, ved platespredning (HPC).



Figur 14 Vekst av bakterier.

For filtermaterialet ble det lest av kolonier på samme måte etter 4 dager. Det var utslag på de samme type kolonier i både vannfasen og i filtermaterialet. Ved å se på antall dyrkbare bakterier i filtermaterialet, er det ingen vesentlig forskjell på kolonnene. Det ser ut til at høye konsentrasjoner av nanosølv ikke påvirker den mikrobielle aktiviteten.



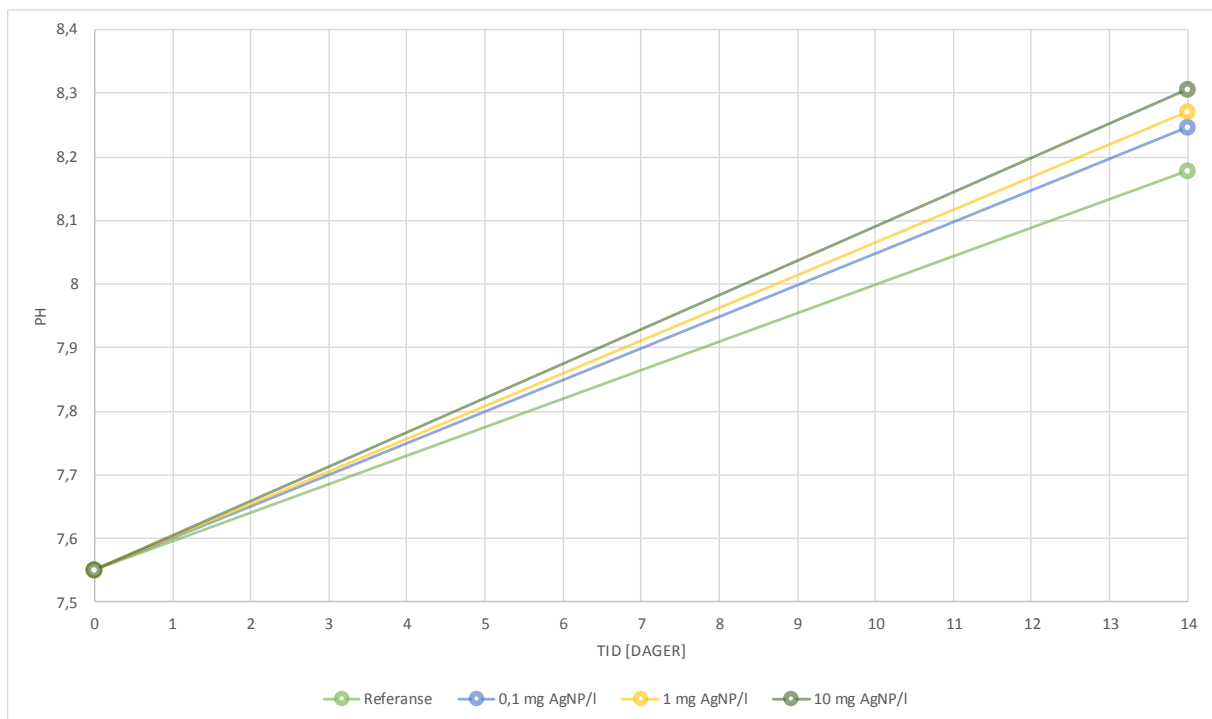
Figur 15 HPC i CFU/ml for filtermediet etter 14 dager.

Det merkes ikke om mikroorganismene har blitt inhibert av nanosølv eller ikke. Det kan være en type bakterie har blitt inhibert. Det vil ikke vise seg på bakterieantallet, i og med at grupper kan erstatte hverandre.

3.2.4 pH

pH verdien for de ulike kolonnene er vist i figuren nedenfor. Det er små forskjeller mellom kolonnene på pH verdien etter 14 dager, men til felles har alle fått en økning av pH. Dette kan skyldes nitrifikasjonsprosesser i biofilmen. Det vil at det er et tegn på at det er blitt dannet biofilm i filtermediet. Dette kunne blitt undersøkt ved å måle på nitrogenforbindelser, som sier noe om hvor godt biofilmen fungerer. På grunn av mangel på analysesett for nitrogenforbindelser, er det ikke blitt tatt prøver av disse.

Disse resultatene kan knyttes til HPC i filtermediet, hvor vi ser at den mikrobielle aktiviteten er omtrent lik for alle kolonnene.



Figur 16 pH ved start og etter 14 dager.

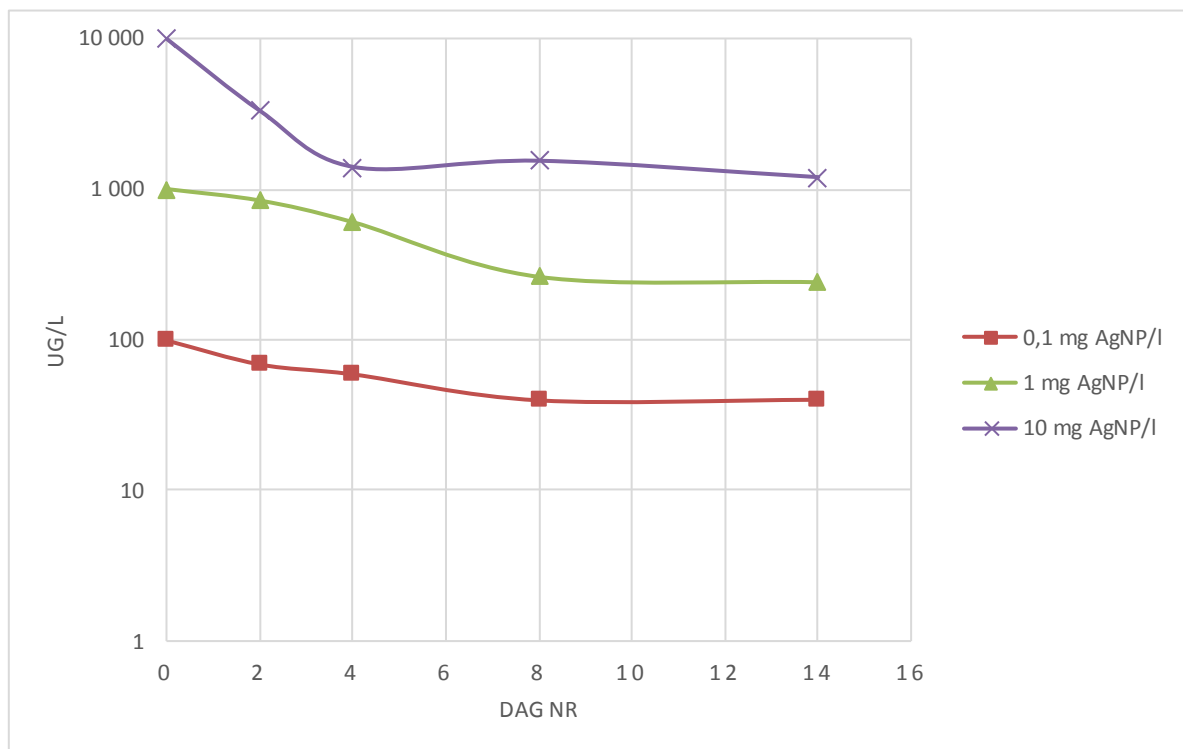
3.2.5 Temperatur

Vannet i beholderne hadde en temperatur på 18-20C gjennom hele perioden. Dette var en gunstig temperatur for mikrobiell aktivitet.

3.2.6 Ag⁺ konsentrasjoner

Det ble tatt prøver for å finne ut konsentrasjonen av sølvpartikler i vannet 5 ganger totalt. Figur 18 viser grafen for konsentrasjon av Ag⁺ gjennom prøveperioden, fra start til slutt.

Det ble en rask reduksjon av sølvpartikler i vannet etter allerede to dager. Etter fire dager fortsatte reduksjonen sterkt, mens halvveis i forsøksperioden så det ut til å jevne seg ut. Det er lite forskjell på dag 7 og 14 for alle konsentrasjonene.



Figur 17 Konsentrasjoner av Ag (isotop 107) for de forskjellige konsentrasjoner.

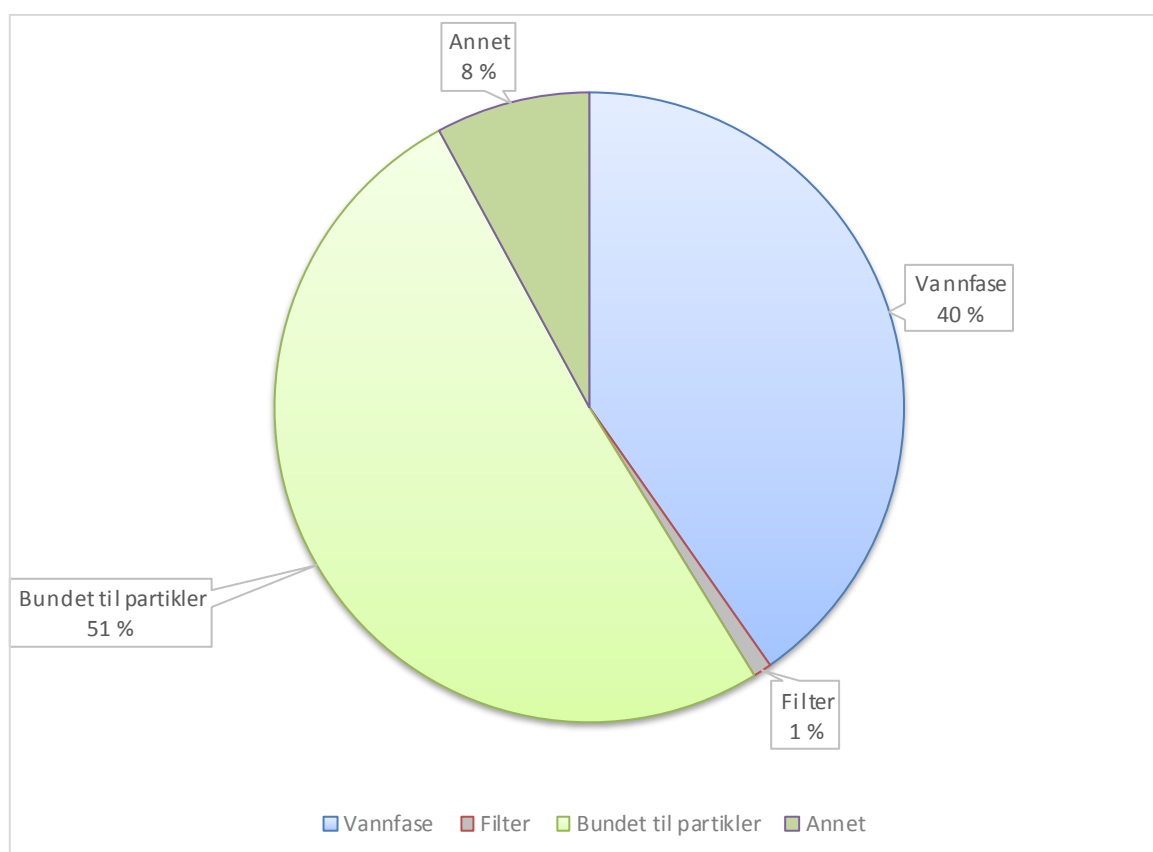
For å finne ut skjebnen til nanosølv i systemet, ble sølvpartikler i vannfasen og i filtermediet målt, samt sedimentert materiale i beholderne etter 14 dager. Sektordiagrammene viser andelen som var igjen å finne i systemet. Og tabellen nedenfor angir konsentrasjonen av Ag⁺ i filtermediet i mg/kg tørrstoff.

Det var ~1% Ag⁺ bundet til filtermediet i kolonnen med 0,1 mg/l nanosølv, ~35% ble bundet i 1,0 mg/l nanosølv og ~14% i kolonnen med 10 mg/l nanosølv.

Tabell 11 Prøver av filtermaterialet. Verdiene er oppgitt i mg/kg tørrstoff.

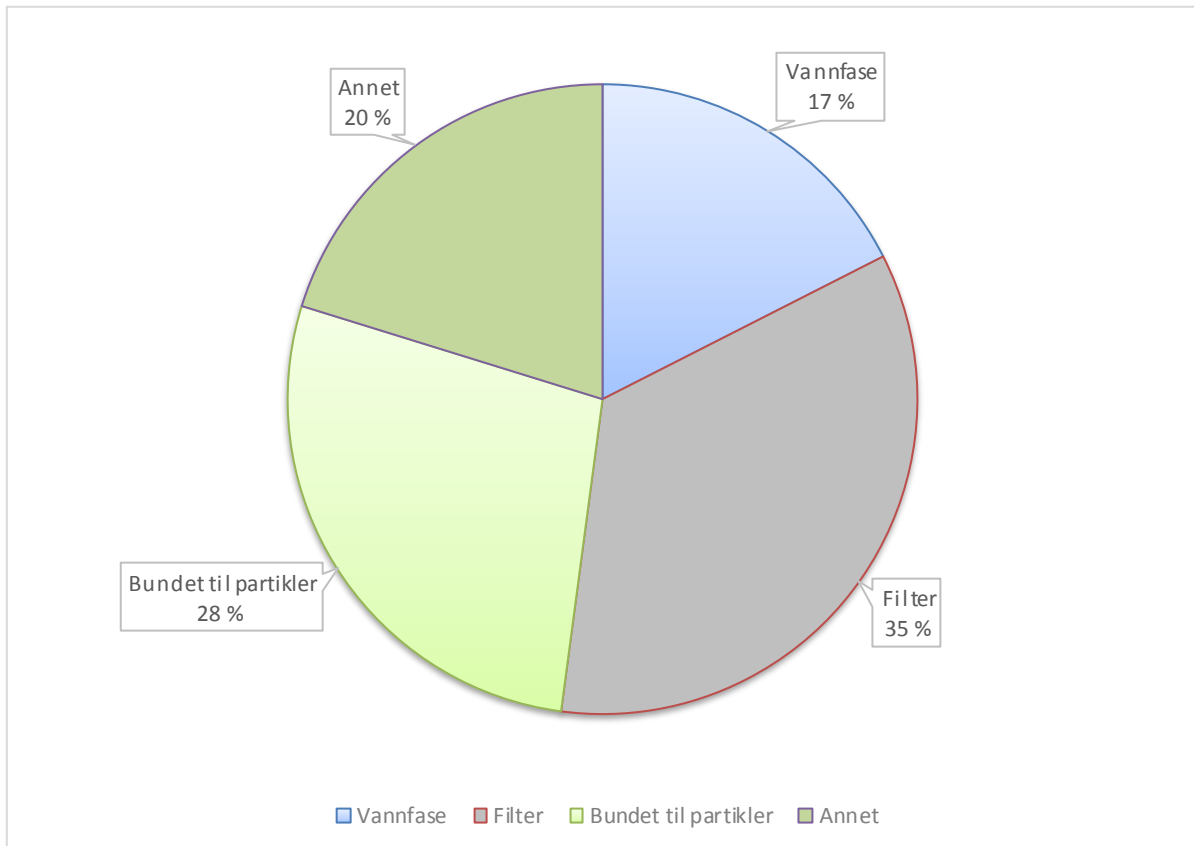
	Referanse	0,1 mg AgNP/l	1,0 mg AgNP/l	10 mg AgNP/l
Konsentrasjon i mg/kg	0,0427	0,1340	0,6267	44,50

For kolonnen med tilsatt 0,1 mg Ag-NP/l, var det 40% av den tilsatte konsentrasjonen som kom ut igjen i vannfasen. Hele 51% var bundet til sedimentert slam i beholderen. Filteret klarte å binde til seg 1% sølvpartikler, mens 8% er ikke funnet igjen noen av stedene. Her slippes de fleste av sølvpartiklene ut igjen i vannfasen, det vil si det blir sluppet ut til naturen. 40,3 µg/l er omtrent det dobbelte av det som ble holdt tilbake igjen i slammet til gråvannrensaneanlegget A02. Og dette er kun i vannfasen. I tillegg er ~51 µg/l med slammet som også kommer ut igjen i naturen hvis det blir brukt til jordforbedring, som vil si at det aller meste av sølvpartiklene her slippes ut av renseprosessen her.



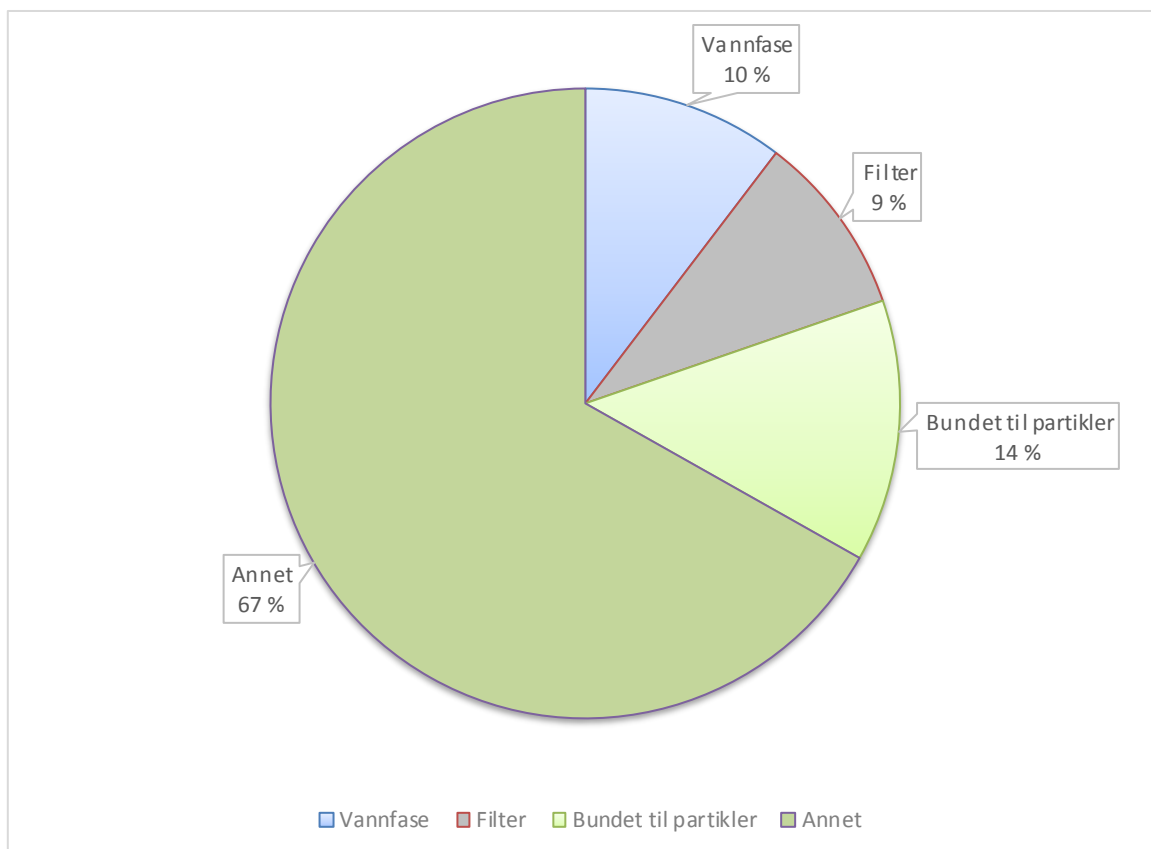
Figur 18 Skjebnen til 0,1 mg/l tilsatt nanosølv i det biologiske gråvannssystemet.

Kolonnen som ble tilsatt 1,0 mg/l nanosølv, hadde en annen fordeling av sølvpartiklene. Det er mye som er holdt tilbake, hele 35%, samtidig er 28% bundet til partikler. Det er betydelig mindre som kommer ut igjen i vannfasen, sammenlignet med kolonnen med lavere konsentrasjon.



Figur 19 Skjebnen til 1 mg/l tilsatt nanosølv i det biologiske gråvannssystemet.

For kolonnen med 10 mg Ag-NP/l, var det lite som ble funnet igjen. 10% ble funnet i vannfasen, 9% i filteret og 14% bundet til sedimenterte partikler.



Figur 20 Skjebnen til 10 mg/l tilsatt nanosølv i det biologiske gråvannssystemet.

Andelen som hadde senket seg ned til bunns og bundet seg til sedimenterte partikler i beholderen var høyest for den laveste tilsatte konsentrasjonen, med hele 51% som ble funnet igjen i sedimenterte partikler og lavest for kolonnen med høyest konsentrasjon, 14%.

Grunnen til at mye av sølvpartiklene ikke ble funnet igjen, kan være på grunn ekstraksjonsmetoden som ble brukt. Det kan være mye mer som er bundet til filteret som ikke er fanget opp. Det er vanskelig å løse opp dette, og det er ikke sikkert prøvene som ble tatt ut er representative for hele kolonnene. Det er bedre å se på del for del i kolonnene, slik at det blir fanget opp mest mulig. Det er mulig at store deler er fanget på toppen av kolonnen for eksempel, eller at det klarer å komme seg gjennom halvveis men stopper opp for det meste i midten av kolonnen. Det som er oppført som «annet» er ikke borte. Det er mest sannsynlig knyttet til ekstraksjoner av prøvematerialet, og representativitet.

3.2.7 Utslipp til miljø

For å se på det som et miljøaspekt, er det ikke sikkert at nanosølv er så harmløs likevel. Selv om det ikke gjør skade på et slikt rensesystem per dags dato, er det ikke dermed gitt at det ikke vil gjøre fremtidig skade, om bruken av det ikke blir mer bevisstgjort. Om bakteriene som dannes i biofilmen kan være resistente, er det også mulig for andre bakterier å bli resistente mot en slik forbruksvare. Resistente bakterier er et økende problem, og nanosølv er et av de produktene på markedet som forårsaket antiresistans.

I Norge er et mål at slam skal brukes til jordforbedringsmiddel så langt det er mulig og forsvarlig på jordbruksarealer- der korn produseres, eller på grøntarealer. I et kretsløpsbasert anlegg, som er ansett som fremtidens typer anlegg, er det en selvfølge at slam ikke blir sett på som et avfall, men organisk gjødsel. For at slam skal kunne brukes på jorda, må innholdet av tungmetaller og mikroforurensninger være lave. Sølv er av ett av disse tungmetallene som skal ha lave nivåer for at det skal kunne bli brukt til jordforbedring. Dette er enda en grunn til å bevisstgjøre bruken mer, da store mengder av sølvioner kan stoppe opp dette kretsløpet.

3.3 Potensielle feilkilder og diskusjon av metode

Feilkilder i dette forsøket med tanke på sølvpartikler i avløpsrenseanlegget, er at det kan være variasjoner i innløpsvannet. Det som kommer inn fra dag til annen kan variere, ved at bruken av vaskemaskinen varierer i løpet av uken. Det er usikkert om prøvene ble tatt ved et stort skyll, eller om det ble tatt ved en dag med lite aktivitet i studentsamfunnet. I et lite avløpsrenseanlegg for så få mennesker, kan variasjonene være større enn for et stor konvensjonelt renseanlegg som har relativt jevne konsentrasjoner på innløpet.

For å få et helhetlig bilde av den potensielle påvirkning av nanosølv, bør det analyseres for flere parametere. Blant annet nitrifikasjonsprosesser og fosfor. Anlegget bør også kjøres i lengre periode slik at det blir dannet mer stabil biofilm. For tilførsel av vann inn i kolonnene, er det bedre å ha variasjon på kvaliteten og kvantiteten til innløpsvannet lik det som kommer inn i et renseanlegg. Tidsmønsteret for innløpsvann er ikke likt gjennom hele dagen for avløpsrenseanlegg, dermed blir det mer realistisk å kjøre systemet i et tidsmønster som er ulik gjennom dagen og natten.

Metoden som ble brukt er nok til å si at nanosølv ikke fører til negative påvirkninger på viktige parametere i avløpsvannet, og styrker teorien om at mesteparten av sølvpartikler aggregerer og blir bundet til partikler i slammet. Den sterke reduksjonen på BOF₅ og KOF skyldes dannelsen av biofilm, og den var omtrent lik for alle kolonnene.

4 Konklusjon

Nanosølv som kommer i gråvannet til en biologisk renseprosess påvirker ikke dannelsen av biofilm, og ødelegger den heller ikke. Parametere som biologisk- og kjemisk oksygenforbruk er uendret sammenlignet med gråvann som ikke inneholder nanosølv. Renseeffekten med hensyn på koliforme bakterier og *E.coli* økes med økende konsentrasjon av nanosølv. Antall dyrkbare bakterier reduseres i gråvannet, samtidig som det ikke påvirker biologisk aktivitet i filtermediet.

Mesteparten av nanosølvet holdes tilbake ved at det blir bundet til filtermediet, eller bundet til partikler i vannet. Ved å la vannet sedimentere før det renner videre til filtermediet, er allerede mesteparten av sølvpartiklene holdt tilbake. Selv i gråvannsrenseanlegget for studentene, klarte sedimenteringsprosessene å holde tilbake opp mot 90% av sølvpartiklene som ble funnet i de forskjellige renseprosessene.

Utslipp fra gråvannsrenseanlegg med hensyn på nanosølv, kan gjøre skade på naturen ved at det er mye som slippes ut i vannfasen. Ved å ha minst mulig partikler ved utslipp, kan dette problemet reduseres sterkt.

For avløpsslammet, som kan inneholde og bære på så store konsentrasjoner av nanosølv, kan det være spørsmål om det ikke vil påvirke jordforbedringspotensialet til slammet som brukes til jordforbedring. Samtidig kan det stilles spørsmål om nanosølv klarer å komme inn i maten vår fra jordbruk, som både mennesker og dyr konsumerer. I så fall, vil kretsløpsbasert renseteknologi fortsette å være gunstig for fremtiden?

5 Referanser

Denne oppgaven er basert på følgende papirer, som refereres til i teksten etter angitte nummer;

1. Commission, T.E., *COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial*. Official Journal of the European Union, 2011. **L 275/38**: p. 3.
2. Chen, X. and H.J. Schluesener, *Nanosilver: a nanoproduct in medical application*. Toxicol Lett, 2008. **176**(1): p. 1-12.
3. Nowack, B., H.F. Krug, and M. Height, *120 years of nanosilver history: implications for policy makers*. Environ Sci Technol, 2011. **45**(4): p. 1177-83.
4. Sanford, J. and R. Venkatapathy, *State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More*. In: Varner, K., editor. *Scientific, Technical, Research, Engineering, and Modeling Support: Final Report*. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development,; 2010: p. 1-197.
5. Schluesener, J.K. and H.J. Schluesener, *Nanosilver: application and novel aspects of toxicology*. Arch Toxicol, 2013. **87**(4).
6. Piccinno, F., et al., *Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world*. 2012. **14**(1109).
7. *The Project on Emerging Nanotechnologies* 2014; Available from: <http://www.nanotechproject.org/>.
8. Sütterlin, S., *Aspects of Bacterial Resistance to Silver*, in *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*. 2015, Acta Universitatis Upsaliensis: Uppsala. p. 64.
9. Gottschalk, F., et al., *Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis*. Environ Toxicol Chem, 2010. **29**(5): p. 1036.
10. Bilberg, K., et al., *Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*)*. Aquat Toxicol, 2010. **96**(2): p. 159-65.
11. Farkas, J., et al., *Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes*. Aquat Toxicol, 2010. **96**(1): p. 44-52.
12. Allen, H.J., et al., *Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna**. Environ Toxicol Chem, 2010. **29**(12): p. 2742-50.

13. Oukarroum, A., et al., *Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, Chlorella vulgaris and Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012. **78**: p. 80-5.
14. Mendes, L.A., et al., *Ag Nanoparticles (Ag NM300K) in the Terrestrial Environment: Effects at Population and Cellular Level in Folsomia candida (Collembola)*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015. **12**(10): p. 12530-12542.
15. Heckmann, L.H., et al., *Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm Eisenia fetida*. *Ecotoxicology*, 2011. **20**(1): p. 226-33.
16. Tsyusko, O.V., et al., *Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 2012. **171**: p. 249-255.
17. Hänsch, M. and C. Emmerling, *Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2010. **173**: p. 554-558.
18. Louma, S.N., *Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges*. 2008.
19. Hedberg, J., C. Baresel, and I.O. Wallinder, *Transport and fate of silver as polymer-stabilised nanoparticles and ions in a pilot wastewater treatment plant, followed by sludge digestion and disposal of sludge/soil mixtures: A case study*. *Journal of Environmental Science and Health*, 2014.
20. Ødegaard, H., et al., *Vann- og avløpsteknikk*. 2014: Norsk Vann.
21. Libralato, G., A. Volpi Ghidardini, and F. Avezzu, *To centralise or to decentralise: An overview of the most recent trends in wastewater treatment management*. *Journal of Environmental Management*, 2012. **94**(1): p. 61-68.
22. Kangas, P.C., *Ecological Engineering: Principles and Practice*. 2004: Lewis Publishers.
23. Etnier, C. and B. Guterstam, *Ecological engineering for wastewater treatment*. 2nd ed. ed. 1997, Boca Raton: CRC Press.
24. Kløwe, B., et al., *Proceedings of the 4th int. conf. on Ecol. Eng. for Wastewater Treatment*. *Managing the wastewater resource*, 1999.
25. Mancl, K., *Onsite wastewater treatment. Proc. 9th Int. Conf. On Individual and Small Community Sewage Systems*. 2001: p. 200-206.

26. Mbwette, T.S.A., et al., *Wetland systems for water pollution control. Proc. 8th Int. Conf. on Wetland Systems for Water Pollution Control*, in *Constructed Wetlands & Waste Stabilization Ponds Research Group*. 2002, University of Daar es Salaam og IWA, Tanzania.
27. Werner, C., et al., *Eco-san – closing the loop*. 2004: Eschborn, Tyskland.
28. Heistad, A., P.D. Jenssen, and A.S. Frydenlund, *A new combined distribution and pretreatment unit for wastewater soil infiltration systems*. 2001.
29. P. D. Jenssen, S. A. Jonasson, and A. Heistad, *Naturbasert rensing av avløpsvann – en kunnskapssammenstilling med hovedvekt på norske erfaringer*. 2006, Institutt for Matematiske realfag og Teknologi. p. 65.
30. Langergraber, G. and E. Muellegger, *Ecological Sanitation--a way to solve global sanitation problems?* *Environ Int*, 2005. **31**(3): p. 433-44.
31. Rosemarin, A., *Sustainable sanitation and water in small urban centres*. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2005. **51**(8): p. 109-118.
32. U. Pinto, B.L. Maheshwari, and H.S. Grewal, *Effects of greywater irrigation on plant growth, water use and soil properties*. *Resources, Conservation and Recycling*, 2008. **54**(2010): p. 429-435.
33. Al-Jayyousi, O.R., *Greywater reuse: towards sustainable water management*. *Desalination*, 2003. **156**(1): p. 181-192.
34. Meinzinger, F.O., M., *Characteristics of source-separated household wastewater flows: a statistical assessment*. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2009. **59**(9): p. 1785.
35. Tortoa, G.J., F. B.R, and C.I. Case, *Microbiology An Introduction*. , ed. utg. 2014: Pearson Education Limited 2014.
36. WHO, *Guidelines for Drinking-water Quality*. 2011: Geneve, Sveits: World Health Organization.
37. Paruch, A.M. and T. Mæhlum, *Specific features of Escherichia coli that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment*. *Ecological Indicators*, 2012. **23**: p. 140-142.

38. Walker, S.L., *The role of nutrient presence on the adhesion kinetics of Burkholderia cepacia G4g and ENV435g*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005. **45**(3–4): p. 181-188.
39. Link, A., et al., *Effects of growth conditions and NAPL presence on transport of Pseudomonas saccharophilia P15 through porous media*. Water Research, 2010. **44**(9): p. 2793-2802.
40. Haznedaroglu, B.Z., C.H. Bolster, and S.L. Walker, *The role of starvation on Escherichia coli adhesion and transport in saturated porous media*. Water Research, 2008. **42**(6–7).
41. Hölting, L., *Virus removal during artificial groundwater recharge and the effects of organic matter*, in *Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences*. 2015, Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden.
42. Bouwer, H., *Artificial recharge of groundwater: hydrogeology and engineering*. Hydrogeol. J, 2002. **10**: p. 121-142.
43. John, D.E. and J.B. Rose, *Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater*. 2005. **39**: p. 7345-7356.
44. Lindberg, T., Lindqvist, R, *Dricksvatten och mikrobiologiska risiker*. 2005.
45. Ødegaard, H., et al., *Veiledning for dimensjonering av avløpsrensaneanlegg*, in *Norsk Vann rapport*. 2009.
46. J.Joner, E., *Tungmetaller i slam- risiko for matkvalitet*. 2016, Norsk Institutt for Bioøkonomi (NIBIO) Seksjon Jordkvalitet og Klima.
47. Weber. Available from: [http://www.filtralite.com/sites/default/files/right_column/bloc_documentation/16m -
_product_data_sheet_filtralite_nr_2-4_0.pdf](http://www.filtralite.com/sites/default/files/right_column/bloc_documentation/16m_-_product_data_sheet_filtralite_nr_2-4_0.pdf).
48. Andy Booth, K.A.J., *SOP- NANoREG-ECOTOX Dispersion Protocol*, in *Protocol for producing reproducible dispersions of manufactured nanomaterials in environmental exposure media*. 2015.
49. Dichter, G., *IDEXX Colilert*-18 and Quanti-Tray* Test Method for the Detection of Fecal Coliforms in Wastewater*. 2011.
50. Mattilsynet, *Bestemmelse av koliforme bakterier i drikkevann*. 2006.

VEDLEGG A: Datagrunnlag for bestemmelse av konsentrasjoner i gråvannsanalyser

Tabell 12 Resultater fra ICP-MS 10.04.17. Konsentrasjonene i µg/L som er funnet er ved 10x fortynninger.

Type	Sample Name	107 -> 107 Ag [O2]		109 -> 109 Ag [O2]	
		Conc. [ug/l]	Conc. [ug/l]	Conc. [ug/l]	Conc. [ug/l]
Sample	wash	0,017054005	<0,039	0,015785373	<0,04
Sample	wash	0,009625059	<LD	0,009650342	<LD
Sample	wash	0,006908945	<LD	0,00536426	<LD
Sample	Acid blank 1	0,017558771	<0,039	0,016012172	<0,04
Sample	Acid blank 2	0,012351216	<0,039	0,009993378	<LD
Sample	Acid blank 3	0,008083165	<LD	0,007414827	<LD
Sample	Acid blank 4	0,008101932	<LD	0,005528844	<LD
Sample	Acid blank 5	0,007565633	<LD	0,007357378	<LD
Sample	Acid blank 6	0,013441772	<0,039	0,014632135	<0,04
Sample	14	0,468330578	0,4683	0,454313015	0,4543
Sample	15	0,888705165	0,8887	0,893836602	0,8938
Sample	16	2,398140335	2,398	2,464279589	2,464
Sample	17	0,01272651	<0,039	0,011307643	<LD
Sample	18	0,007459268	<LD	0,009591817	<LD
Sample	19	3,021763367	3,022	3,008310721	3,008
Sample	110	2,998279413	2,998	3,019039208	3,019
Sample	111	0,015602952	<0,039	0,013576163	<0,04
Sample	112	0,009043849	<LD	0,009474122	<LD
Sample	113	0,05021762	0,05022	0,040933484	0,04093
Sample	114	0,058583018	0,05858	0,059179706	0,05918
Sample	115	0,051208075	0,05121	0,050747567	0,05075
Sample	24	2,067551558	2,068	1,98621658	1,986
Sample	25	3,167533904	3,168	3,055613738	3,056
Sample	26	2,552926758	2,553	2,44190464	2,442
Sample	27	1,194153357	1,194	1,10416595	1,104
Sample	28	1,09573349	1,096	1,037539854	1,038
Sample	29	1,168246866	1,168	1,070128843	1,07

VEDLEGG B: Resultater fra første analyserunde

Disse resultatene er fra første runde med UltraWAVE forberedelser og ICP-MS. Det er store usikkerheter knyttet til disse resultatene, derfor er de ikke tatt med i rapporten, men brukt til å sammenlignes med resultater fra andre analyserunde.

Tabell 13 Analyseresultater for Ag 109 i µg/l

Type prøve	Ag 109 µg/l
Ubehandlet gråvann	0,1994
Ubehandlet gråvann	-0,0296
Ubehandlet gråvann	0,0028
Primærsedimentering (1)	26,4382
Primærsedimentering (1)	16,8082
Primærsedimentering (1)	17,6582
Før biofilter	0,3314
Før biofilter	0,1277
Før biofilter	0,0566
Sekundærsedimentering (2)	10,4282
Sekundærsedimentering (2)	9,4142
Sekundærsedimentering (2)	10,4682
A02 utløp	-
A02 utløp	-0,0347
A02 utløp	-
Kolonne A2	-0,0042
Kolonne A2	-0,0017
Kolonne A2	0,0143



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway