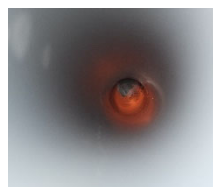


Slambildning och mikrobiell sammansättning av biofilm i infiltrationsanläggningar



Inga Herrmann
Charlotta Larsson
Britt-Marie Wilen
Bodil Forsberg



Slambildning och mikrobiell sammansättning av biofilm i infiltrationsanläggningar

Inga Herrmann
Charlotta Larsson
Britt-Marie Wilen
Bodil Forsberg

ISSN 1402-1536

ISBN 978-91-7790-464-9 (pdf)

Luleå 2019

www.ltu.se

Denna rapport sammanfattar resultaten från projektet *Mikroflora i markbaserade reningsanläggningar* som genomfördes vid Luleå tekniska universitet (LTU) i samarbete med Kungsbacka kommun och Chalmers under åren 2017 och 2018. Projektet finansierades av Havs- och vattenmyndigheten genom anslag 1:11 Åtgärder för havs- och vattenmiljö och medfinansierades av LTU och Kungsbacka kommun.

Förutom rapportförfattarna har många personer bidragit och hjälpt till med arbetet i projektet vilket vi är mycket tacksamma för!

Kerstin Nordqvist (LTU) genomförde fosfor- och kväveanalyser samt analys av partikelstorlekar och hjälpte till med provtagningens alla för- och efterberedelser. Peter Rosander (LTU) var till stor hjälp vid provtagning av markbäddssanden. Jonas Brännlund och Frieder Hamann (LTU) hjälpte till med vattenprovtagningar, kamerainspektion samt mätningar i lab och fält. Ahmed Al-Rubaei hjälpte till med siktning av jordprover. Vi tackar alla fastighetsägare som bidrog med information om anläggningarna och tillät oss att ta vattenprover och prover från infiltrationsbädden genom borrhning och grävning. Vi tackar Åsa Gunnarsson (HaV) för visat intresse och en givande dag i fält.

Författarna hoppas att resultaten som presenteras i rapporten kommer att vara till nytta inom branschen, för myndigheter, fastighetsägare, tillverkare, forskare och andra intresserade.

Inga Herrmann

Luleå 15/9 2019

1 Inledning	1
2 Metod	3
2.1 Beskrivning av de sex undersökta infiltrationsanläggningarna	3
2.2 Tillvägagångssätt	5
2.3 Visuell inspektion	5
2.3.1 Slamförekomst i slamavskiljare, fördelningsbrunn och luftningsrör	5
2.3.2 Kamerainspektion av spridarledningar	6
2.4 Mätning av grundvattenstånd	6
2.5 Ventilation	6
2.5.1 Ventilation av slamavskiljare - ventilationstest med rök i slamavskiljare	6
2.5.2 Ventilation av infiltrationsbädden - genomsläpplighet av omgivande jord	7
2.6 Mätning av ingående vattenkvalitet	7
2.6.1 Provtagning från slamavskiljare	7
2.6.2 Provhantering och analyser	7
2.5 Undersökning av slam och biohud	8
2.5.1 Provtagning från infiltrationsbädd och fördelningsbrunn	8
2.5.2 Bestämning av den organiska fraktionen	9
2.5.3 Mikroskopering	9
2.5.4 DNA-extraktion, PCR och sekvensering	9
2.5.5 Sekvenseringsanalys	9
3 Resultat	10
3.1 Slamförekomst: visuella observationer och kamerainspektion	10
3.2 Avstånd till grundvattenytan	11
3.3 Ventilation	12
3.4 Mikroflora	12
3.4.1 Mikroskopering	13
3.4.2 Mikrobiell sammansättning (DNA sekvensering)	15
3.5 Kvalité av ingående vatten till infiltrationsanläggningarna	20
4 Diskussion	22
4.1 Mikroflora i infiltrationssanden	22

4.2 Slamavskiljarnas funktion	23
4.3 Partiklar och kolloider i ingående vattnet till infiltrationsanläggningarna	23
4.4 Inspektion av infiltrationsanläggningar	24
4.5 Igensättning	25
5 Slutsatser	27
6 Referenser	28

Markbaserade reningstekniker utgör den största andelen av de små avloppssystemen i Sverige. Med små avloppsanläggningar avses anläggningar som är dimensionerade för upp till 200 pe. Ca 30% av alla små avlopp är infiltrationsanläggningar (Olshammar, Ek et al., 2015). Infiltrationsanläggningar bedöms generellt som en robust och driftsäker teknik som är enkel att använda (Johansson, 2002) och som har en pålitlig reningseffekt om den dimensioneras och byggs på rätt sätt (Palm, Malmén et al., 2002). En infiltration består vanligtvis av ett spridarlager av makadam i vilket spridarledningar förläggs och ett sandlager (förstärkningslager eller underliggande jord) där det bildas en biofilm och där reningen sker. Reningen är effektiv med avseende på organiskt material och smittämnen om avståndet till grundvattnet är tillräckligt stort (det bör inte understiga en meter) (Naturvårdsverket, 2003). Det bedöms vidare att en stor del av kvävet omvandlas till nitrat (Johansson, 2002). Fosfor renas genom kemiska reaktioner mellan fosfatfosfor i avloppsvattnet och jord- eller sandmaterialet. Dock kan upptaget av fosfor i förstärkningslagret som vanligtvis är 30 cm i mäktighet anses vara litet (Eveborn, Kong et al., 2012). Däremot är det sannolikt att en stor del av fosfor fastnar i jorden efter infiltrationsanläggningen om retentionsförutsättningarna är goda.

Infiltrationsanläggningar kan sätta igen dvs. den hydrauliska konduktiviteten kan minska med tiden (Spychala and Blazejewski, 2004; Sychala, Niec et al., 2013). I nyligen genomförda projekt har det konstaterats en förekomst av slamliknande material i markbaserade anläggningar i Kungsbacka kommun. Slambildning förekom i fördelningsbrunn, spridningsledningar och luftningsrör i varierande mängd (Miljösamverkan Halland, 2016; Larsson, Forsberg et al., 2017). Det påvisades att förekomsten av slam varierade över tid (Larsson, Forsberg et al., 2017). Slam används här som beteckning för biomassa som oavsett ursprung och uppkomst finns i andra delar av anläggningen än i slamavskiljaren. Användningen av ordet slam i denna rapport skiljer sig alltså från definitionen av avloppsslam i NFS 2016:16 där det anges som "Sedimenterat slam, behandlat eller obehandlat, från avloppsreningsanläggning".

Slamförekomst i infiltrationsanläggningar kan vara vanlig men upptäcks inte alltid eftersom nyare anläggningar sällan följs upp. Slamförekomsten är möjligtvis problematisk därför att slammet kan påverka BOD-, bakterie- och fosforreningen i bädden samt leda till att bäddarna sätter igen och behöver göras om i förtid. För att bättre förstå förekomsten av slam i anläggningarna och eventuell påverkan på anläggningarnas funktion krävs kunskap om slammets sammansättning. Medan det finns god kompetens och kännedom om slamproblem och mikrofloran i stora avloppsreningsverk, är kunskapen liten när det gäller små avlopp trots att icke-fungerade små avlopp för med sig stora privata och samhällsekonomiska konsekvenser.

Den mikrobiella sammansättningen av slam eller biofilm kan mätas med s.k. NGS (Next-Generation Sequencing) som är en relativt ny och mycket kraftfull metod för att kartlägga bakteriepopulationer i olika typer av prover. NGS möjliggör en massiv sekvensering av deoxiribonukleinsyra (DNA) sekvenser framtagna efter DNA-extraktion och PCR (Polymerase Chain Reaction). Små enheter av DNA-sekvenser är specifika för olika grupper av bakterier, tex den s.k. V4 regionen som i den här studien. I den s.k. Illumina-tekniken identifieras korta sekvenser på 300 baspar x 2. Metoden har hög känslighet och är mycket specifik, endast en liten mängd DNA (ng/ μ L) räcker för att kunna kartlägga den mikrobiella sammansättningen. En stor mängd data genereras och relativt stor datakraft krävs samt avancerad bioinformatik.

Målet med denna studie var att undersöka möjliga orsaker för slambildning i infiltrationsanläggningar genom att undersöka sex infiltrationsanläggningar i Kungsbacka kommun med avseende på

- förekomst av slam i anläggningarnas olika delar,
- sammansättning av ingående vatten,
- mikrobiell sammansättning av slam och biofilm, och
- anläggningarnas ventilation.

2.1 Beskrivning av de sex undersökta infiltrationsanläggningarna

Anläggningarna valdes ut med hjälp av resultat från tidigare projekt som hade genomförts i Kungsbacka kommun (Larsson, Forsberg et al., 2017). En lista med potentiellt lämpliga anläggningar togs fram av kommunen, 10 anläggningar besöktes. Av dessa valdes sex infiltrationsanläggningar (A–F) ut för provtagning. Alla anläggningar var försedda med grundvattenrör. Information om anläggningarna har sammanställts i Tabell 1 och specifik information om infiltrationsbäddarna i Tabell 2. I anläggning A hade tidigare funnits problem med slam i fördelningsbrunnen och spridarledningar och spolningar hade genomförts.

Tabell 1. Generella egenskaper hos de undersökta avloppsanläggningarna.

Anläggning	Byggår	Antal användare	Pump i anläggningen	Slamavskiljare		
				Volym (m ³)	Material	Utlopp
A	okt 2014	2	nej	2	Betong	osynligt
B	sep 2014	2	ja	2	betong	t-rör utan borste
C	mar 2015	2	nej	2	betong ^b	t-rör utan borste
D	okt 2013	6	nej	4	plast	fack ^a
E	sep 2014	2	nej	2,2	plast	fack ^a
F	feb 2013	3	nej	2	betong ^b	t-rör med borste

^a utloppsfack, se Figur 1

^b befintlig slamavskiljare (som var äldre än resten av anläggningen)

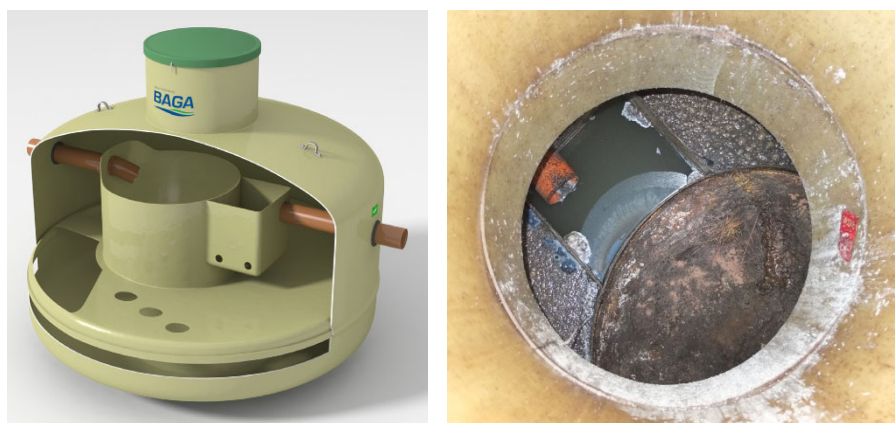
Slamavskiljarna i anläggningarna A–C och F var traditionella trekammarbrunnar i betong. I anläggningarna D och E användes slamavskiljare i plast (Figur 1) där inkommande vattnet tvingades ner till botten genom en inloppscylder, slammagasinet på botten var täckt av en fördelningsskiva och utgående vattnet lämnade slamavskiljaren genom ett utloppsfack med hål vid sidan (Figur 1). De undersökta slamavskiljarna tömdes en gång per år, senaste tömningen hade skett mellan augusti och december 2017 dvs. provtagningen skedde mellan fyra till åtta månader efter tömningen.

Tabell 2. Egenskaper hos de undersökta infiltrationsbäddarna i anläggningarna A–F.

Anläggning	Bredd × längd (m)	Bäddens yta (m ²)	Antal spridar- ledningar	Förstärknings- lager (tjocklek i cm)	Lutning spridarledningar (‰)	Återfyllnad (tjocklek i cm)
A	3,5 × 9,5	33	2	30	9,5 / 7,4	70 ^a
B	4 × 7,5	30	4	70	-	>50 ^b
C	3 × 10	30	3	30	11 / 9 / 9	41 ^a
D	4 × 15	60	4	50	-	>50 ^b
E	3 × 10	30	3	0	-	87 ^a
F	3 × 10	30	3	30	18 / 17 / 15	60 ^a

^a punktmätning (ungefärlig) som gjordes under sandprovtagningen^b uppgift från anläggningens utförandeintyg

De undersökta infiltrationsanläggningarna hade en yta på ca 30 m² (Tabell 1), förutom anläggning D som var dimensionerad för två hushåll och hade en yta på 60 m². Spridningslagret var 30 cm tjockt i alla bäddar, materialet som användes var naturgrus (anläggning B) och tvättad makadam (C, D, F). I anläggningarna A och E var det troligtvis också makadam, men det är okänt om det var tvättat (i anläggning A är det dock sannolikt att det var det). Förutom anläggning E var alla infiltrationsanläggningar anlagda med förstärkningslager av varierande tjocklek (Tabell 2) som bestod av sandmaterial med kornstorlekar mellan 0–8 mm (0,2–8 mm i anläggning F). Återfyllnaden (jordmaterial ovanpå bädden) var av varierande tjocklek (Tabell 2), mellan 41 och 87 cm. Bäddarna i anläggningar B, E och F var upphöjda pga sluttning i terrängen (återfyllnadens övre kant låg (delvis) över marknivå). De naturliga underliggande jordarterna under och omkring anläggningarna bestämdes inte.



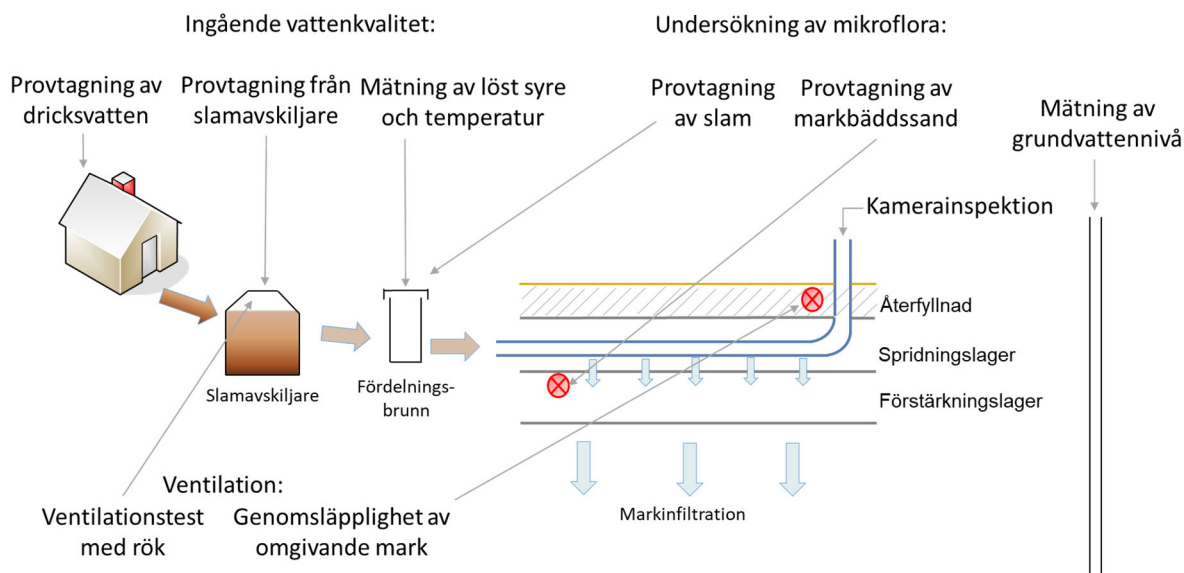
Figur 1 Slamavskiljare med utloppssock som användes i anläggningarna D och E (till vänster, bild från Baga Water Technology, slamavskiljare - broschyr, www.baga.se) och slamavskiljare sett ovanifrån (till höger, fotat vid anläggning D).

Samtliga fastigheter försörjdes med dricksvatten genom egen brunn. Både grävda brunnar (A–C) och borrhälsbrunnar (D–F) förekom. Fastigheterna A och D hade ett dricksvattenfilter installerat. Fastighet A hade kopplat backspolningsvattnet till avloppsanläggningen.

2.2 Tillvägagångssätt

Vid varje anläggning gjordes undersökningar som syftade till att hitta möjliga anledningar till slambildning i infiltrationsanläggningar. Undersökningarna utfördes mellan oktober 2017 och juni 2018. Följande undersökningar utfördes:

- förekomst av slam genom visuell inspektion och kamerainspektion av spridarledningar,
- förekomst och sammansättning av mikroorganismer i slam från fördelningsbrunnen och biohud från förstärkningslagret genom mikroskopering och sekvensering av deoxiribonukleinsyra (DNA),
- analys av ingående vattnet till infiltrationsanläggningen med avseende på halten suspenderat material, biologisk syreförbrukning, organiskt kol, fosfor, kväve, järn, fett och löst syre, andelen kolloider samt temperatur och pH,
- dricksvattenkvaliteten med hänsyn till järnkoncentration,
- ventilation av slamavskiljaren genom ventilationstest med rökpatron och mätning av halten löst syre i sista kammaren, samt
- möjligheten till lufttillförsel till infiltrationsbädden genom att bestämma genomsläppligheten av omgivande jord och avstånd till grundvattenytan.



Figur 2 Översikt över provtagnings- och mätpunkter i de undersökta infiltrationsanläggningarna.

2.3 Visuell inspektion

2.3.1 Slamförekomst i slamavskiljare, fördelningsbrunn och luftningsrör

Anläggningarna A–F inspekterades visuellt genom att syna ytan av slamavskiljarens tredje kammare (A–C och F) eller utloppsfack (D, E), fördelningsbrunnen samt luftningsrören med hjälp av en ficklampa (Figur 3). Inspektion skedde vid åtta tillfällen för anläggning A och E

och vid sju tillfällen för anläggningarna B–D och F under provtagningsperioden (oktober 2017 till juni 2018).



Figur 3 Inspektion av luftningsrör med ficklampa

2.3.2 Kamerainspektion av spridarledningar

Varje anläggnings spridningsledningar inspekterades med kamera vid ett tillfälle. Kameran som användes var en RIDGID Seasnake CS10 (Ridge tool company, Elyria, Ohio, USA). Ledningarna inspekterades från änden (via luftningsröret) fram till fördelningsbrunnen. Filmningen sparades på ett USB-minne.

2.4 Mätning av grundvattenstånd

Alla undersökta infiltrationsanläggningar var utrustade med grundvattenrör. Grundvattennivåns djup från rörets överkant mättes med hjälp av klucklod. Höjden av grundvattenrörets överkant och spridarledningens underkant i fördelningsbrunnen mättes med hjälp av planlaser. Grundvattennivåns avstånd till spridarledningens underkant beräknades.

2.5 Ventilation

2.5.1 Ventilation av slamavskiljare - ventilationstest med rök i slamavskiljare

En slamavskiljare ventileras vanligtvis genom att den ansluts till en ventilerad avloppsinstallation i huset och avluftas över byggnadens tak. Ventilation i slamavskiljarna A–F testades med hjälp av rök. En rökpatrik tändes och fästes vid slamavskiljarens innervägg. Om rök syntes över taknocken inom 10 minuter ansågs slamavskiljaren ha ventilation. Lufttemperaturen noterades.

2.5.2 Ventilation av infiltrationsbädden - genomsläpplighet av omgivande jord

Vid varje anläggning togs jordprov av återfyllnaden, dvs. jorden ovanpå infiltrationsbädden, för att uppskatta markens genomsläpplighet. Jordproverna siktades i laboratoriet enligt svensk standard SS 027123 (modifierad) (Swedish Standards Institute, 1992). För siktningen användes siktar med maskvidd 0,14 mm, 0,28 mm, 0,4 mm, 0,8 mm, 1,12 mm, 2,24 mm, 3,15 mm och 6,3 mm. Jordens genomsläpplighet beräknades efter Hazen och Beyer (Wendehorst, 1998) enligt ekvation 1.

$$k_f = 0,0116 * U^{-0,201} * d_{10}^2 \quad (\text{ekv. 1})$$

där

k_f = vattengenomtränglighet (hydraulisk konduktivitet) i m/s,

$$U = \text{graderingstal} = \frac{d_{60}}{d_{10}},$$

d_{60} , d_{10} = korndiametern i mm vid vilken 60% respektive 10% av partiklarna i jordmassan passerar en sikt med en maskvidd av samma diameter.

2.6 Mätning av ingående vattenkvalitet

2.6.1 Provtagning från slamavskiljare

För att bestämma kvaliteten av ingående vatten till infiltrationsanläggningarna A–F togs prover från slamavskiljarens tredje kammare och utloppsfack. Där prover togs från slamavskiljarens tredje kammare (anläggningar A–C och F) användes en Rüttner-provtagare som möjliggjorde uppsamling av vattenprov under vattenytan och nära utloppsröret medan inblandning av slam från vattenytan minimerades. Där prover togs från slamavskiljarens utloppsfack (D och E) användes en vattenprovtagare med bågare och skaft. Prover togs upprepade gånger, sju gånger vid anläggning A, sex gånger vid anläggningarna B–E och fem gånger vid anläggning F.

Proverna analyserades på halten suspenderat material, totalt organiskt kol (TOC), biologisk syreförbrukning (BOD_7), fosfor, kväve, eterlösligt och emulgerat fett och järn. Partikelstorleksfördelningen bestämdes för att bestämma andelen kolloider bland partiklarna. Dessutom mättes pH-värdet. Halten löst syre och temperatur mättes direkt i slamavskiljarens sista kammare och därutöver även i fördelningsbrunnen.

2.6.2 Provhantering och analyser

Halten suspenderat material och pH-värdet bestämdes på plats direkt efter provtagning. Prover för analys av fosfor, kväve, BOD_7 , TOC och järn frystes på provtagningsdagen och förvarades fryst fram till analys (fosfor och kväve) eller fram till inlämning till ackrediterat laboratorium (BOD_7 , TOC och järn). Prover för analys av partikelstorleksfördelning och fett förvarades svalt i kylväska och analyserades senast påföljande dag.

Halten suspenderat material bestämdes enligt standarden EN 872:2005 (Swedish Standards Institute, 2005a). Halten totalfosfor analyserades spektrometriskt med ammoniummolybdatmeto-

den med QuAAtro AutoAnalyzer metod nr. Q-031-04 efter uppslutning (oxidation) med peroxodisulfat (Swedish Standards Institute, 2005b). Halten totalkväve analyserades med QuAAtro AutoAnalyzer metod nr. Q-003-04 efter uppslutning (oxidation) med peroxodisulfat enligt SS-EN ISO 11905-1. Järnkonzentrationen bestämdes med ICP-SFMS (inductively coupled plasma sector field mass spectrometry) enligt SS-EN ISO 17294-2:2016 (modifierad). BOD₇ analyserades enligt SS-EN 1899. TOC analyserades enligt DIN EN 1484 (H3). Partikelstorleksfördelning analyserades med laserdiffraction med instrumentet HORIBA LA-960 Laser Scattering Particle Size Analyzer, andelen kolloider bestämdes med partikelantal som transformationsbas. Bestämning av pH gjordes med en WTW pH-meter 330 (Weilheim, Tyskland) och en WTW SenTix®41 pH-elektrod. Halten löst syre och temperatur mättes i slamavskiljarens sista kammare och i fördelningsbrunnen med en YSI löst syre-meter model 58 (Yellow Springs, Ohio).

2.5 Undersökning av slam och biohud

2.5.1 Provtagning från infiltrationsbädd och fördelningsbrunn

Prover togs från förstärkningslagret av alla infiltrationsbäddar A–F. Dessutom togs prover från slammet i fördelningsbrunnen av anläggning A (från slamkakan på vattenytan) och C (från slammet på fördelningsbrunnens botten och från flytslamhuden på ytan). Sammanlagt togs 9 prover för mikroskopering och DNA sekvensering.

Prover från förstärkningslagret i de olika anläggningarna togs vid två tillfällen under april och maj 2018. Proverna togs i början av bädden nära fördelningsbrunnen (mellan 1,50 och 4,20 m från fördelningsbrunnens kant) eftersom det antogs vara störst sannolikhet för förekomst av bakterier. För att luckra upp jorden på bädden användes en motordriven TDU 155 jordborr med en diameter av 180 mm. Sedan användes spade för att gräva en grop ner till duken ovanpå spridarlagret (Figur 2). Duken klipptes försiktigt upp (ny duk lades på efter provtagning för återställning) för att sedan borra genom spridarlagret in i förstärkningslagret. För att göra detta användes en jordborr för grov sand i anläggningar A, B och D och en spiralborr i anläggningar C, E och F (Figur 2). Då jordborr för grov sand användes togs proverna från övre delen av förstärkningslagret. Med spiralborren som användes vid anläggningarna C, E och F borrades igenom hela förstärkningslagret så att ett blandprov kunde tas.



Figur 4 Grävd grop ner till spridarlagret (vänster), grov jordborr (nedre) och spiralborr (övre) som användes vid provtagning av sandmaterial från förstärkningslagret (mitten) och sandprov från förstärkningslagret (höger).

2.5.2 Bestämning av den organiska fraktionen

För att få en uppfattning om hur mycket biomassa som finns i de olika markbäddsproverna samt i fördelningsbrunnsslammen mättes den organiska fraktionen. Den organiska fraktionen i proverna mättes genom att först torka proverna i en ugn i 2 timmar vid 105°C varefter provet brändes vid 550°C. Skillnaden i vikt vid dessa temperaturer delat med vikten vid 105°C utgör den organiska fraktionen (eller flyktig fraktion).

2.5.3 Mikroskopering

Biomassan i proverna analyserades genom mikroskopering med ett Olympus BX60 ljusmikroskop (Olympus AB, Solna, Sverige) och programvaran CellSens (Olympus). Bilder togs vid 100X, 200X, 400X och 1000X förstoring. Vid mikroskopering av markbäddssanden tillsattes några droppar vatten för att det suspenderade materialet som finns dels mellan men även på sandkornen skulle lossna och hamna i vattenfas.

2.5.4 DNA-extraktion, PCR och sekvensering

Totalt genomiskt DNA extraherades med hjälp av Fast Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) och protokollet från fabrikanten följdes. V4-regionen av 16 rRNA-genen amplifierades i triplikat med hjälp av den framåtriktade primern 515'F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') och den bakåtriktade primern 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') enligt (Kozich, Westcott et al., 2013). PCR (polymerase chain reaction) reaktionen utfördes med hjälp av en Biometra T3000 Thermocycler. PCR-produkten renades med MagJet NGS Cleanup och Size Selection kit (Thermo Scientific). Koncentrationen av DNA mättes sedan med en Qubit 3.0 fluorometer (Invitrogen) genom att använda ett dsDNA HS reagens (Invitrogen). Proverna slogs sedan samman i samma koncentrationer och fragmentlängd mättes med en TapeStation 2200 (Agilent Technologies). Sekvenseringen genomfördes med MiSeq med reagenskit v3 (Illumina).

2.5.5 Sekvenseringsanalys

Sekvenserna processades med algoritmen UNOISE (Edgar and Flyvbjerg, 2015; Edgar, 2016) i programvaran USEARCH v.10 (Edgar, 2010). Detta resulterar i s.k. *Sequence Variants* (SV) vilka klassificerades taxonomiskt med SINTAX-algoritmen (Edgar, 2010) och databasen MIDAS (McIlroy, Saunders et al., 2015). Färgdiagram användes för att visa fraktionerna av de vanligaste klasserna och släktena av bakterier och arkéer i proverna. Beta diversitet, dvs skillnaden i mikrobiell sammansättning mellan proverna, beräknades genom parvis jämförelse av proverna och visualiserades med multidimensionell skalning. Analyserna utfördes med programvaran qDiv (<https://github.com/omvatten/qDiv>).

3.1 Slamförekomst: visuella observationer och kamerainspektion

Slamförekomst i slamavskiljare, fördelningsbrunn och luftningsrör undersöktes genom visuella observationer. I alla slamavskiljares sista kammare eller utloppssock observerades slam vid några av inspektionerna och vid alla inspektioner observerades slam eller vatten i minst ett av luftningsrören vid samtliga undersökta anläggningar (Tabell 3). Vid enbart två anläggningar (B och D) observerades aldrig slam på vattenytan i fördelningsbrunnen.

Tabell 3 Visuellt observerad förekomst av slam i slamavskiljarens sista kammare eller utloppssock, fördelningsbrunn och luftningsrör vid anläggningarna A–F samt resultat från kamerainspektionen av spridarledningarna. I parentes visas antalet besökstillfällen.

Anläggning	Slamavskiljare	Fördelningsbrunn	Luftningsrör ^a
A	ja (8)	ja (8)	ja (8)
B	ja (5), nej (2)	nej (7)	ja (8)
C	ja (6), nej (1)	ja (6), nej (1)	ja (6), nej (1)
D	ja (4), nej (3)	nej (4)	nej (3), ja (1)
E	ja (8)	ja (6), nej (1)	nej (6), ja (2)
F	ja (3), nej (1)	ja (3), nej (1)	ja (6), nej (1)

^a ”Ja” betyder att förekomst av vatten eller slam observerades i minst ett av luftningsrören

Spridarledningarna undersöktes med hjälp av kamera (Tabell 4, Figur 5). Några av spridarledningarna visade sig vara torra/reña, med enbart lite vatten stående i ledningsdelen närmast fördelningsbrunnen (B, C, D och F). I några spridarledningar fanns vatten stående över hela ledningslängden (A, C, E och F). Vattennivån låg mellan några millimeter och några (få) centimeter, men var svåruppskattad. Intryck av ”smutsiga” spridarledningar uppstod enbart vid anläggning A, där kameran och sladden blev täckta av svart slam och krävde omfattande rengöring. Det observerades dock med kameran att det svarta slammet fanns i kröken mellan spridarledningen och luftningsröret medan slampartiklarna i spridningsledningen var vitaktiga (se Figur 5, bilden till höger).

Tabell 4 Observationer från kamerainspektionen av spridarledningarna vid anläggningarna A–F. FD: fördelningsbrunnen. ”-” indikerar att spridarledningen inte fanns.

Anläggning	Spridarledning			
	1	2	3	4
A	slam och vatten, hela vägen	vatten, svart slam, hela vägen	-	-
B	vatten vid FD	rent	vatten vid FD	rent
C	vatten vid FD	lite vatten	vatten hela vägen	-
D	vatten vid FD	torrt, lite slam	vatten vid FD	lite vatten vid FD
E	lite slam	vatten hela vägen	vatten hela vägen	-
F	vatten vid FD	vatten hela vägen	vatten hela vägen	-



Figur 5 Exempel på bilder som erhöles vid kamerainspektion av spridarledningarna. Till vänster syns en ledningsträcka med stående vatten (anläggning D), i mitten en torr ledningssträcka (anläggning D) och till höger en ledning med både vatten och slam-partiklar (anläggning A).

3.2 Avstånd till grundvattenytan

Grundvattennivån i grundvattenröret mättes vid alla undersökta anläggningar och avståndet mellan spridarledningens underkant och grundvattenytan bestämdes för anläggningar A, C, D och F (Tabell 5). I anläggningarna B och E bestämdes inte nivån av spridarledningens botten i relation till nivån av grundvattenrörets överkant så grundvattenytans avstånd till spridarledningen kunde inte bestämmas. Det är dock troligt att grundvattenytan även i dessa fall låg under förstärkningslagret därför att grundvattenröret var torrt vid alla mättillfällen. Vid anläggning D var grundvattenröret anlagt för grunt (enbart 88 cm under botten på spridarledning). Under projektets mätperiod låg grundvattenytan under förstärkningslagret vid anläggningarna A, C, D och F och troligtvis även vid anläggningarna B och E.

Tabell 5 Avstånd mellan spridarledningens botten och grundvattenytan i de undersökta anläggningarna under mätperioden.

Anläggning	Grundvattenstånd under botten på spridarledning [cm]			
	medel	antal mätningar	min	max
A	76	7	57	100
B	torrt ^a	6	-	-
C	127	7	89	158
D	torrt (>88)	8	-	-
E	torrt ^a	7	-	-
F	torrt, >139	6	-	-

^a grundvattenrör var anlagt med tillräckligt djup (vid tidigare/senare inspektioner uppmättes grundvattenavstånd >1m)

3.3 Ventilation

Resultat från ventilationstest med rökpatron som genomfördes i slamavskiljaren visas i Tabell 6. Enbart två av anläggningarna (B och C) visades ha ventilation över taknock.

Markens permeabilitet uppskattades med hjälp av kornstorleksfördelningskurvorna som bestämdes för jordproverna tagna från återfyllnaden (Tabell 6). Kornstorleksfördelningen varierade mellan proverna och därmed graderingstalet och den beräknade genomsläppligheten. Vid anläggningarna A, B, D och F låg graderingstalet mellan 6 och 14 vilket tyder på mellangradegrad jord (morän) (Larsson, 2008). Ett graderingstal <6 (anläggningar C och E) tyder på ensgraderad jord (sediment).

Tabell 6 Resultat från ventilationstestet med rökpatron Parametrar från kornstorleksfördelningarna som bestämdes för prover tagna från återfyllnaden samt permeabilitet av några jordarter (Larsson, 2008). d_{60} , d_{10} : korndiametern i mm vid vilken 60% respektive 10% av partiklarna i jordmassan passerar en sikt med en maskvidd av samma diameter, $U = d_{60}/d_{10}$: graderingstal, kf: vattengenomtränglighet (hydrauliska konduktivitet).

Anläggning	Ventilation över taknock	Parametrar från kornstorleksfördelningen			
		d_{10} [mm]	d_{60} [mm]	$U=d_{60}/d_{10}$	kf [m/s]
A	nej	0,1	1	10	7×10^{-5}
B	ja	0,05	0,7	14	$1,7 \times 10^{-5}$
C	ja	0,2	1	5	$3,4 \times 10^{-4}$
D	nej	0,025	0,2	8	$4,8 \times 10^{-6}$
E	nej	0,1	0,5	5	$8,4 \times 10^{-5}$
F	nej	0,2	1,45	7	$3,1 \times 10^{-4}$
Jordart					
Grusig morän					10^{-5} – 10^{-7a}
Sandig morän					10^{-6} – 10^{-8a}
Mellansand					10^{-3} – 10^{-5a}
Finsand					10^{-4} – 10^{-6a}

^a värden från Larsson (2008)

3.4 Mikroflora

Den organiska fraktionen i de olika proverna varierade stort. Slammet från fördelningsbrunnarna innehöll högre halter organiskt material än sanden från fördelningslagren.

Tabell 7 Provtagningspunkter för kartläggning av den mikrobiella floran och den i proverna uppmätta organiska fraktionen

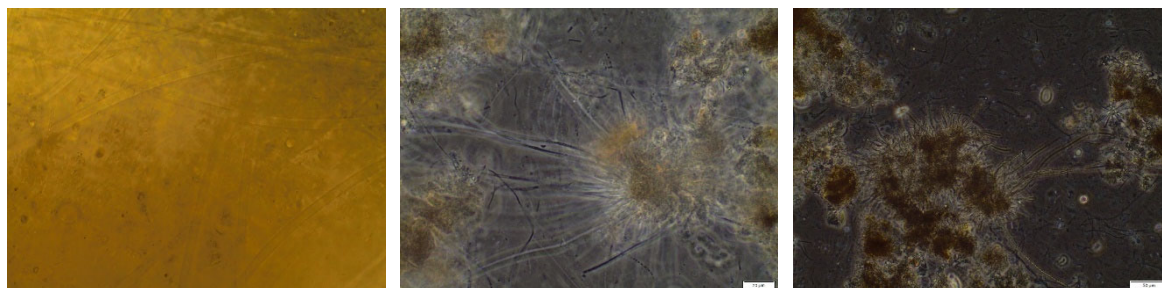
Anläggning	Prov	Beskrivning	Organisk fraktion [%]
A	sand ^a	Sand från förstärkningslager	0,19
A	slam ^b	Slam från fördelningsbrunn	3,17
B	sand ^a	Sand från förstärkningslager	0,33
C	flytslam ^b	Flytslam från fördelningsbrunn	0,52
C	sand ^a	Sand från förstärkningslager	0,31
C	slam ^b	Slam från fördelningsbrunnens botten	0,62
D	sand ^a	Sand från förstärkningslager	0,27
E	sand ^a	Sand från jorden under spridarlagret	0,16
F	sand ^a	Sand från förstärkningslager	0,14

^a sand från infiltrationsanläggningens sandlager under fördelningslagret

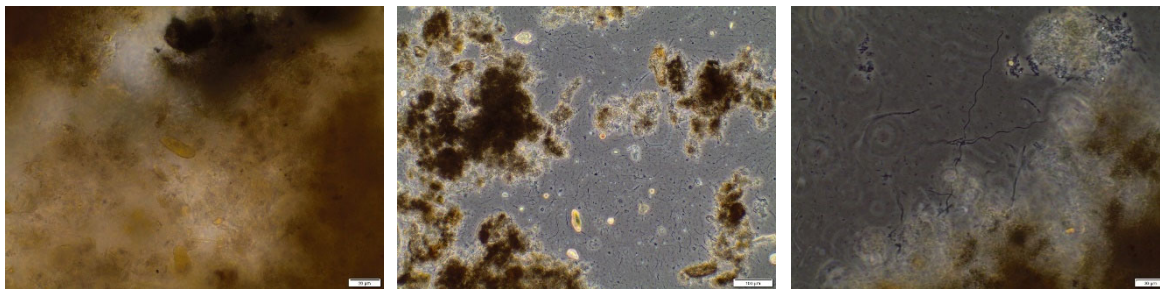
^b slamprov från anläggningens fördelningsbrunn

3.4.1 Mikroskopering

Nio prover togs för mikroskopering, tre från slammet i fördelningsbrunnarna vid anläggning A och C och sex prover från förstärkningslagret (A–F, Tabell 7). I slamproverna från fördelningsbrunnarna syntes slamflockar men också filamentväxande bakterier, både fastsittande på flockar samt frisimmande i vattnet (Figur 6). Dessutom sågs högre encelliga organismer (protozoer), frisimmande bakterier som möjligen var spirochetes och runda gulaktiga partiklar (Figur 7).

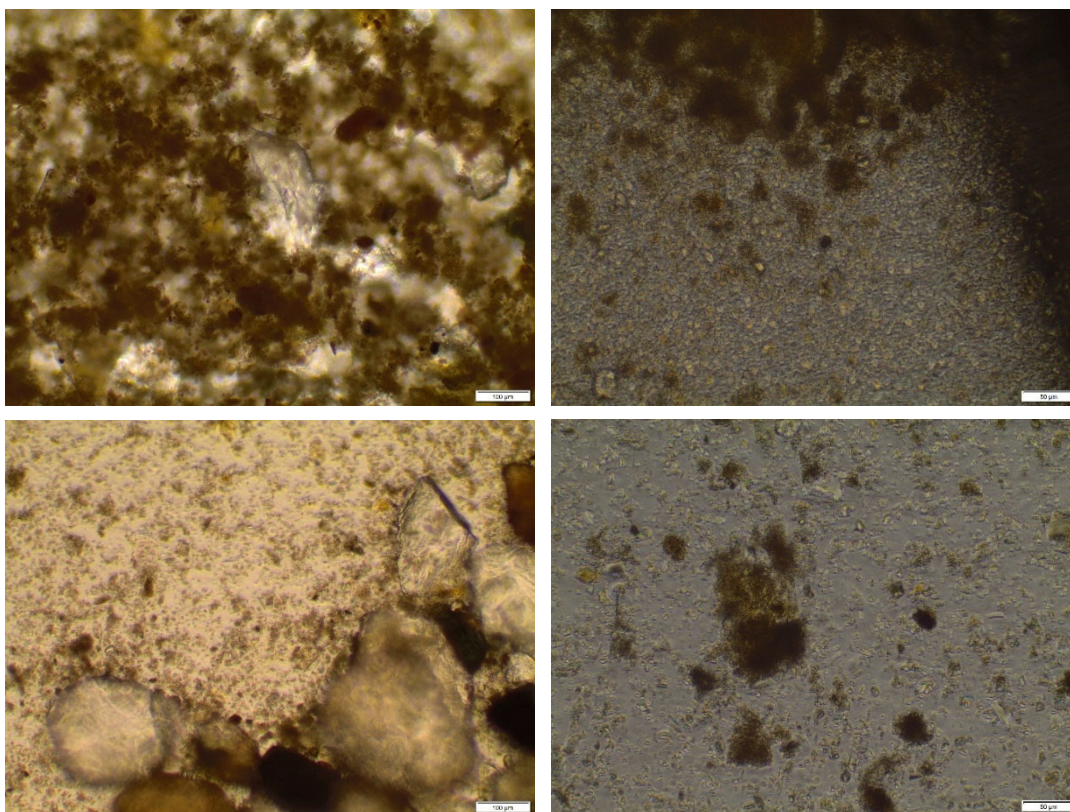


Figur 6 Bilder från mikroskopering av prover från fördelningsbrunnarna vid anläggningarna A (vänster) och C (mitten och höger) som visar slamflockar med filamentväxande bakterier. Den vänstra bilden visar stora och tjocka filament som växer inuti slamflockarna (1000X förstoring). Slamflockar med filamentväxande bakterier fanns både i provet från fördelningsbrunnens botten (mitten, 400X förstoring) och provet från slamkakan på vattenytan i fördelningsbrunnen (höger, 200X förstoring) i anläggning C.



Figur 7 Bilder från mikroskopering av prover från fördelningsbrunnarna vid anläggningarna A och C. Till vänster: Runda gulaktiga partiklar i provet från fördelningsbrunnen i anläggning A (400X förstoring). I mitten: Slam som innehåller både frisimmande och fastsittande encelliga protozoer samt en stor andel filamentväxande bakterier i provet från slamkakan vid anläggning C (100X förstoring). Till höger: Frisimmande bakterier som möjligen kan vara spirochetes i provet från slamkakan vid anläggning C (400X förstoring).

Vid mikroskopering av markbäddssanden tillsattes några droppar vatten för att det suspenderade materialet som finns dels mellan men även på sandkornen skulle lossna och hamna i vattenfas. Det suspenderade materialet liknade aktivt slam i ett konventionellt avloppsreningsverk (Figur 8).



Figur 8 Bilder från mikroskoperingen av proverna från markbäddssanden i anläggningarna B, C, D och F. Övre vänster: En stor mängd slamliknande flockar kan ses mellan sandkornen (vita partiklar i bilden). Anläggning B, 100X förstoring. Övre höger: Stora slamflockar och frilevande bakterier. Anläggning C, 200X förstoring. Nedre vänster: Små slamflockar kan ses mellan sandpartiklarna. Anläggning D, 10X förstoring. Nedre höger: Stora slamflockar kan ses mellan sandkornen. Dessutom växer en hel del bakterier i bulkfasen (dvs. i vattenfasen mellan sandkornen). Anläggning F, 200X förstoring.

3.4.2 Mikrobiell sammansättning (DNA sekvensering)

Det fanns DNA i alla prover, dock lägre halter i sandprover från anläggning C och E. Sekvenseringen resulterade i totalt 23 346 olika sekvensvarianter (totalt i alla prover) vilket i princip motsvarar olika arter av bakterier. När sekvensvarianterna klassificeras taxonomiskt kan de grupperas på olika ekologiska nivåer. Antalet grupper på varje ekologisk nivå är sammanfattade i Tabell 8. Resultatet visar att biomassan i alla proverna var mycket artrik. Vid en jämförelse mellan antalet sekvensvarianter mellan de olika proverna kunde ingen stor skillnad uppvisas. I Figur 9 illustreras den mikrobiella sammansättningen i färgdiagram där de olika klasserna av bakterier visas i olika färger. Siffran i varje ruta anger den procentuella andelen inom viss klass av det totala antalet sekvenser. I alla proverna var förekomsten av bakterieklasserna *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Clostridia*, *Sphingobacterii*, *Actinobacteria*, och *Deltaproteobacteria* dominerande.

Tabell 8 Sammanfattning av kända sekvensvarianter i alla proverna

Anläggning - prov	Ekologisk nivå				
	Fylum (phylum)	Klass (class)	Ordning (order)	Familj (family)	Släkte (genus)
Antal kända sekvensvarianter sammantaget i alla proverna	54	107	180	362	705
A - sand	32	67	97	185	247
B - sand	43	86	132	274	454
C - sand	37	77	116	219	287
D - sand	35	63	102	188	306
E - sand	34	67	99	199	295
F - sand	33	73	112	223	334
A - slam	41	74	106	187	293
C - flytslam	38	73	110	197	311
C - slam	38	69	100	169	281

Medelförekomsten av de vanligaste bakterieklasserna i de sex olika sandproverna är sammanfattade i Tabell 9. Proverna innehöll relativt lika mängder av de olika klasserna av bakterier. Liknande resultat uppnåddes med proverna från fördelningsbrunnarna. Eftersom bakterierna på klassnivå innehåller många olika typer av bakterier är det svårt att dra slutsatser om de olika bakterieklassernas funktion. För att bättre kunna analysera bakteriesammansättningen på ett mer detaljerat sätt, gjordes motsvarande analys för olika släkten av bakterier på genusnivå (Figur 10, Tabell 10). Vid en jämförelse mellan de olika sandproverna kan vi se att de innehåller en relativt lika mikrobiell sammansättning.

c_terrestrial	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0	<0.1	0	2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
p_TM6; SV35	0	<0.1	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0.6	2.4	0	0	0
c_South	0.7	0.6	0.3	0	<0.1	<0.1	0.2	0.3	0.2	2.4	0	0	0	0	0	0	0.1	<0.1	<0.1	0.5	0.4	<0.1	<0.1
c_KD4 – 96	0.1	0.1	<0.1	<0.1	0	<0.1	0.7	0.9	0.9	1.8	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.2	1.2	1.3	1.2
c_Negativicutes	<0.1	<0.1	<0.1	0.4	0.3	0.4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.6	1.6	1.8	2.0	1.8	0.4	0.3	0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Nitrospira	<0.1	0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	0.5	0.8	0.8	6.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.3	0.8	1.0	1.0
c_Spartobacteria	0.1	0.1	0.1	<0.1	0.2	0.1	0.6	0.7	0.8	2.6	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	2.1	2.3	2.0
c_Methanomicr	0	0	0	0.4	0.2	0.3	<0.1	<0.1	0	<0.1	2.1	3.3	4.3	0.8	1.0	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0	<0.1
c_JG37 – AG – 4	0.2	0.3	0.1	0	0	0	<0.1	0.2	0.1	11	0	0	0	<0.1	0	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	0.3	0.4	0.4
c_Spirochaetes	<0.1	<0.1	0.1	1.9	1.7	1.7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.5	1.5	1.5	2.4	2.3	<0.1	0.1	0.1	<0.1	<0.1	0	0	<0.1
c_vadinHA17	<0.1	<0.1	<0.1	0.6	0.8	0.9	0	<0.1	0	<0.1	6.1	3.9	4.0	0.9	0.9	0	0	<0.1	0	0	<0.1	0	<0.1
c_Epsilonproteobacteria	0.4	0.9	1.1	2.2	0.6	0.4	1.0	0.9	0.9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	3.5	4.0	0.7	0.6	0.5	0.3	0.2	0.1	<0.1	<0.1
c_Holophagae	1.0	1.3	1.7	1.7	2.2	2.2	0.6	0.9	0.7	2.8	0.5	0.4	0.4	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5
c_PBS – 18	<0.1	<0.1	<0.1	3.8	7.0	5.0	0	0.2	0	<0.1	1.3	0.5	0.5	0.5	0.4	0	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1
c_Thermoleophil	<0.1	0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	2.0	2.3	3.2	1.3	<0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.2	0.2	1.8	2.3	1.8	1.3	2.1
c_Gemmatimonadetes	0.6	0.7	0.6	0.1	0.2	0.2	1.8	2.0	2.0	3.6	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.3	0.8	0.5	0.3	3.5	3.1	0.6	0.6	0.7
c_Planctomycetacia	0.4	0.7	0.8	0.3	0.4	0.5	2.3	2.9	3.0	3.6	0.2	0.2	0.2	0.1	<0.1	2.0	0.9	0.7	2.3	3.0	3.2	2.7	3.1
c_Anaerolineae	<0.1	0.1	0.1	1.6	1.4	1.5	0.3	0.5	0.4	1.2	7.4	6.9	7.6	1.9	2.0	<0.1	<0.1	0	0.1	<0.1	0.3	0.6	0.4
c_Flavobacteri	0.5	0.7	0.9	0.6	0.5	0.8	1.2	1.0	1.2	0.1	0.6	1.0	0.6	1.5	1.7	2.9	3.1	3.0	0.1	0.2	6.6	5.1	5.7
c_Synergistia	<0.1	<0.1	<0.1	0.5	0.5	0.6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	14	10	10	7.9	7.3	0.6	0.3	0.2	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Bacilli	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.9	1.7	3.1	0.4	0.9	3.8	5.7	6.9	7.2	6.6	5.8	5.4	0.9	0.8	2.3	1.4	2.2
c_Deltaproteobacteria	1.1	2.6	5.8	2.5	2.7	2.7	3.1	3.6	4.0	2.5	2.3	4.4	5.8	6.4	6.1	2.8	2.1	1.8	1.5	1.3	1.8	1.5	1.9
c_Acidobacteria	1.1	1.3	1.5	0.4	0.7	0.6	6.4	9.2	9.0	13	0.2	0.2	0.2	0.1	<0.1	1.2	0.6	0.5	2.7	2.7	6.4	7.9	7.0
c_Bacteroidia	0.3	0.3	0.3	7.9	10	10	0.3	0.6	0.4	<0.1	7.3	5.4	5.5	14	13	2.8	2.9	2.3	1.0	0.8	<0.1	<0.1	<0.1
c_Actinobacteria	2.4	4.5	6.6	1.1	1.2	1.3	6.0	4.9	5.3	1.9	1.4	2.1	2.6	1.4	1.5	4.8	3.4	3.1	8.1	8.3	9.0	6.6	8.5
c_Clostridia	1.3	1.6	1.8	6.0	6.9	7.5	3.5	3.7	4.1	0.5	22	17	18	9.6	9.8	2.5	2.5	2.2	3.0	3.2	0.6	0.5	0.5
c_Sphingobacteria	13	12	9.5	6.4	8.9	10	7.8	5.2	5.4	2.0	2.6	2.4	2.0	5.2	5.0	4.5	4.2	4.0	4.4	5.2	4.1	3.6	4.0
c_Alphaproteobacteria	3.1	4.5	7.7	1.8	2.0	2.4	15	14	14	9.7	1.5	1.6	1.9	2.6	2.6	9.7	7.3	6.4	11	11	8.8	8.7	9.2
c_Gammaproteobacteria	20	20	17	5.0	13	7.7	16	15	15	9.4	3.9	12	9.3	9.5	10	29	38	43	34	31	31	33	31
c_Betaproteobacteria	49	43	39	45	26	31	20	18	15	10	13	11	8.0	13	14	21	23	23	18	16	12	14	11
	A sand (1)	A sand (2)	A sand (3)	A sludge (1)	A sludge (2)	A sludge (3)	B sand (1)	B sand (2)	B sand (3)	C sand (1)	C sludge (1)	C sludge (2)	C sludge (3)	C floating sludge (1)	C floating sludge (2)	D sand (1)	D sand (2)	D sand (3)	E sand (1)	E sand (2)	F sand (1)	F sand (2)	F sand (3)

Figur 9 Fördelningen av bakterier inom olika klasser i % (ju mörkare färg desto högre andel har bakterieklassen). Siffran inom parentes anger replikat. c =klass.

c_Nitrospira; SV223	<0.1	<0.1	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	2.8	0	0	0	<0.1	0	0	0	<0.1	0	<0.1	<0.1	<0.1
c_JG37 – AG – 4; SV165	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	2.8	0	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Deltaproteobacteria; g_Geobacter	0.2	0.9	2.8	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	
c_PBS – 18; SV41	<0.1	0	0	1.3	2.8	1.9	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	<0.1	0	0	0	0	0	0
c_Betaproteobacteria; SV28	1.5	1.3	3.3	0	<0.1	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	0
c_Betaproteobacteria; g_Comamonas	<0.1	<0.1	0	1.1	1.5	3.8	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.1	<0.1	0.4	0.3	0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0	<0.1	<0.1
c_Methanomicr	0	0	0	0.3	0.2	0.2	0	<0.1	0	<0.1	1.5	2.2	2.8	0.4	0.6	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0
c_Deltaproteobacteria; g_Smithella	0	0	0	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	<0.1	0.6	2.2	3.1	1.3	1.4	0	0	<0.1	<0.1	0	0	0
c_Gammaproteobacteria; g_Alkanibacter	0.1	0.1	0.1	0	0	0	0.2	0.2	0.3	0.4	0	0	0	0	0	1.0	0.5	0.3	3.2	3.1	<0.1	<0.1
c_Synergistia; SV77	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0	<0.1	2.7	1.8	1.9	1.6	1.5	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	<0.1	0
c_Synergistia; SV87	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	<0.1	3.5	2.6	2.4	0.7	0.7	0	0	0	0	0	0	<0.1
c_PBS – 18; SV31	<0.1	<0.1	<0.1	1.9	3.4	2.4	0	0.1	0	<0.1	0.9	0.4	0.4	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0	0
c_Gammaproteobacteria; g_Metallibacterium	<0.1	<0.1	<0.1	0.8	8.1	1.8	0	0.2	<0.1	0	0	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Betaproteobacteria; SV15	0.1	0.1	<0.1	4.5	3.7	4.6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	<0.1	<0.1
c_Sphingobacteria; SV11	4.8	3.9	2.6	0	<0.1	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	1.0	1.0	<0.1	<0.1
c_Anaerolineae; g_T78	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0	<0.1	4.8	3.9	4.2	0.9	1.0	0	0	0	0	0	0	0
c_Bacteroidia; g_Bacteroides	<0.1	<0.1	<0.1	3.2	3.7	4.1	0.1	0.2	0.1	0	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.6	0.4	0.2	0.4	0.3	<0.1	<0.1
c_Betaproteobacteria; g_Rhizobacter	4.6	3.7	2.0	<0.1	0.2	0.3	0.6	0.3	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	1.4	2.0	0.4	0.7	0.3
c_Gammaproteobacteria; SV16	0.4	0.5	0.1	<0.1	<0.1	0	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.3	0.2	0.1	0.7	0.7	5.6	6.1	5.2
c_Betaproteobacteria; g_Nitrosospira	1.1	1.3	0.8	0	<0.1	<0.1	1.2	1.1	1.2	0.7	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.2	4.9	2.7	1.8	1.6	1.3	0.3	0.3
c_Betaproteobacteria; SV8	0.6	0.5	0.3	2.0	2.4	2.9	0.2	0.3	0.3	<0.1	0.8	0.9	0.4	0.5	0.5	1.8	3.3	3.8	<0.1	<0.1	1.8	1.7
c_Flavobacteri	0.4	0.6	0.6	0.4	0.3	0.5	0.9	0.9	1.1	<0.1	0.3	0.7	0.3	1.0	1.1	2.7	2.9	2.8	<0.1	0.1	4.0	3.4
c_Bacteroidia; g_vadinBC27	<0.1	<0.1	<0.1	2.9	4.2	4.1	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	3.6	2.3	2.4	5.7	5.2	0.3	0.3	0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Clostridia; g_Christensenellaceae	<0.1	<0.1	<0.1	1.6	2.1	2.3	0.1	0.2	0.1	<0.1	8.3	6.0	6.0	2.7	2.8	0.6	0.8	0.7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Betaproteobacteria; g_Zoogloea	0.3	0.2	0.2	2.6	0.6	0.7	<0.1	0.1	0.1	0.4	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	3.3	2.2	2.4	<0.1	0.2	0.5	0.8
c_Betaproteobacteria; g_Dechloromonas	3.6	3.1	2.7	0.7	1.1	1.5	0.5	0.6	0.4	0.1	1.1	2.7	0.7	1.0	1.3	3.4	5.2	5.5	<0.1	<0.1	2.2	1.9
c_Bacilli; g_Trichococcus	0	<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0.5	0.3	0.5	<0.1	0.7	3.5	5.4	6.5	6.8	6.5	5.8	5.4	0.7	0.6	<0.1	<0.1
c_Gammaproteobacteria; g_Thiothrix	0	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	0.4	0.5	0.8	<0.1	2.3	8.6	7.4	4.0	5.1	11	21	29	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
c_Betaproteobacteria; g_Polaromonas	26	22	20	0.2	0.4	0.3	6.5	6.6	4.8	2.5	2.3	1.2	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	1.4	6.7	4.6	0.6	0.7
c_Gammaproteobacteria; g_Rhodanobacter	14	12	9.4	0.1	0.9	0.3	2.5	2.3	2.4	2.3	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	9.5	9.5	6.9	25	22	20	22
A sand (1)																						
A sand (2)																						
A sand (3)																						
A sludge (1)																						
A sludge (2)																						
A sludge (3)																						
B sand (1)																						
B sand (2)																						
B sand (3)																						
C sand (1)																						
C sludge (1)																						
C sludge (2)																						
C sludge (3)																						
C floating sludge (1)																						
C floating sludge (2)																						
D sand (1)																						
D sand (2)																						
D sand (3)																						
E sand (1)																						
E sand (2)																						
F sand (1)																						
F sand (2)																						
F sand (3)																						

Tabell 9 Sammanfattning av de vanligast förekommande klasserna av bakterier i de olika sandproverna, andel i %

Bakterieklasser	Sandprover från infiltrationsanläggningarna A-F					
	A	B	C	D	E	F
<i>Betaproteobacteria</i>	44±4,5	18±2,1	10	23±0,5	18±0,5	12±1,25
<i>Gammaproteobacteria</i>	18±1,4	15±0,9	8,9	35±5,4	32±1,5	30±0,47
<i>Alphaproteobacteria</i>	5,0±1,8	14±0,5	10	7,7±1,4	11±0,0	8,7±0,17
<i>Clostridia</i>	1,6±0,25	3,8±0,19	0,5	1,5±0,14	3,2±0,15	0,53±0,05
<i>Sphigobacterii</i>	11±1,6	5,9±1,1	1,9	4,2±0,17	5±0,35	3,8±1,1
<i>Actinobacteria</i>	4,9±1,9	5,8±0,5	1,9	4,1±0,77	8,9±0,05	8,5±1,07
<i>Bacteroidia</i>	0,3±0,0	0,43±0,12	0	2,7±0,26	0,9±0,1	0
<i>Acidobacteria</i>	1,3±0,16	8±1,3	13	0,7±0,29	2,7±0,0	1,8±0,16
<i>Deltabacteria</i>	3,1±1,9	3,5±0,39	2,5	2,2±0,42	1,4±0,1	2±0,4

Tabell 10 Sammanfattning av de vanligast förekommande klasserna av bakterier i de olika fördelningsbrunnspöverna

Bakterieklasser	Slamprover från fördelningsbrunn		
	A	C (flytslam i fördelningsbrunnen)	C (botten på fördelningsbrunnen)
<i>Betaproteobacteria</i>	34±8,5	14±0,5	11±2,05
<i>Gammaproteobacteria</i>	8,5±3,36	9,6±0,4	7,9±3,07
<i>Alphaproteobacteria</i>	2,0±0,22	2,6±0,0	1,6±0,16
<i>Clostridia</i>	7,0±0,62	9,9±0,1	19±1,9
<i>Sphigobacterii</i>	8,2±1,51	5,1±0,05	2,2±0,25
<i>Actinobacteria</i>	1,27±0,05	1,6±0,1	2,1±0,49
<i>Bacteroidia</i>	9,3±1,04	13±1,0	5,9±0,87
<i>Acidobacteria</i>	0,57±0,12	0,01±0,005	0,17±0,05
<i>Deltabacteria</i>	2,6±0,08	6,3±0,15	4,0±1,4

Den huvudsakliga funktionen hos några av de vanligast förekommande släktena visas i Tabell 11.

Tabell 11 De 30 bakteriesläktena (på genusnivå) av högst förekomst i de olika proverna (A, B och C anger replikat från samma prov)

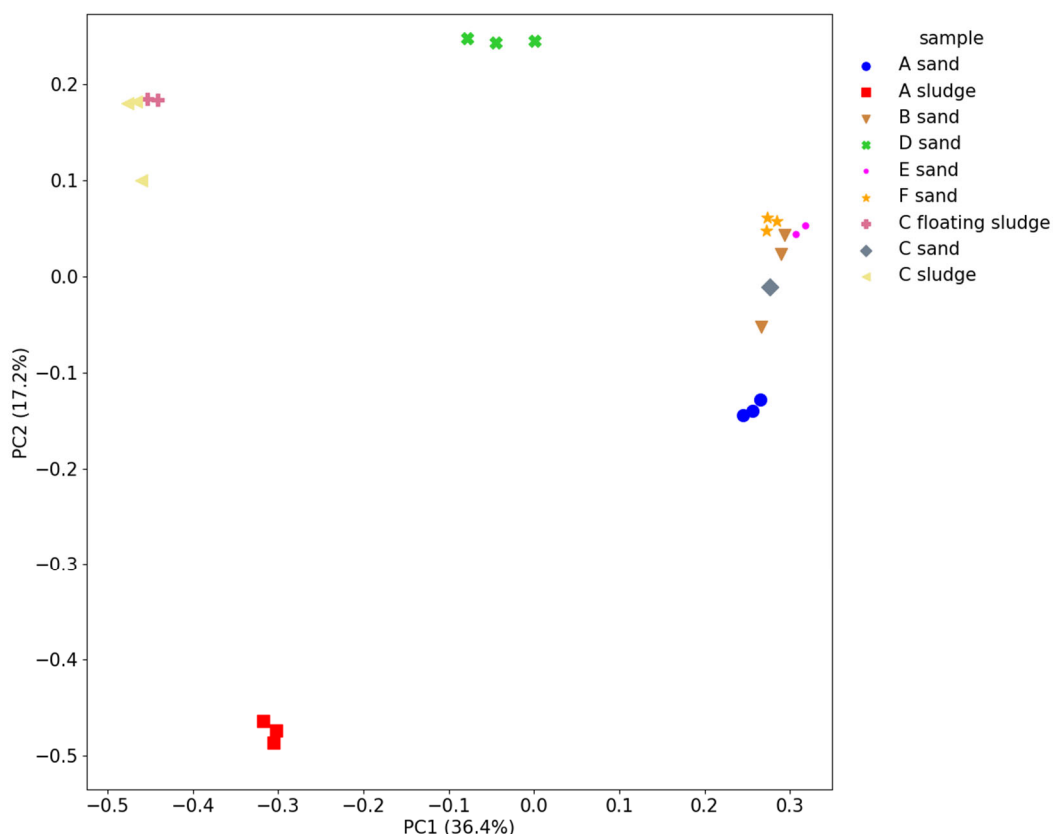
Släkte (genus)	Familj (family)	Ordning (order)	Klass (class)	Fylum (phylum)	Funktion	Referens
Rhodanobacter			Gammaproteobacteria	Proteobacteria		-
Polaromonas	Comamonadaceae		Betaproteobacteria	Proteobacteria		-
Thiothrix	Thiotrichaceae	Thiotrichales	Gammaproteobacteria	Proteobacteria	En filamentväxande bakterie, ofta med Eikelboom typ 21N morfologi. Thiothrix är aerobt heterotrofa. Dessa bakterier kan oxidera svavelhaltiga ämnen såsom sulfid och tiosulfat och producera intracellulära svavelklot.	(Nielsen, Aquino de Muro et al., 2000; Aruga, Kamagata et al., 2002)
Dechloromonas	Rhodocyclaceae	Rhodocyclales	Betaproteobacteria	Proteobacteria	Formar mikrokolonier och kan ta upp fettsyror under anoxiska förhållanden samt kan använda nitrit som elektronacceptor vilket tyder på förmåga till denitrifikation.	(Ginige, Keller et al., 2005; Mcilroy, Starnawska et al., 2016)
Trichococcus	Carnobacteriaceae	Lactobacillales	Bacilli	Firmicutes	Fermentativ organisms som kan växa både aerobt och anaerobt. Vissa kan växa som filament och bidra till bulkigt slam.	(Liu, Burrell et al., 2000)
Zoogloea	Rhodocyclaceae	Rhodocyclales	Betaproteobacteria	Proteobacteria	Denitrifierande bakterie som är mycket vanlig i aktivt slam. Zoogloea bidrar till flockbildning and kan ge upphov till bulkigt slam. Zoogloea är aerob kemoorganotrof.	(Hagman, Nielsen et al., 2008; Larsen, Nielsen et al., 2008)

Tabell 11 (forts)

Flavobacterium	Flavobacteriaceae	Flavobacteriales	Flavobacteriia	Bacterioidetes	Flavobacterium är vanliga i aktivt slam men dess fysiologi är inte bestämd. Uppvisar aerob metabolism men vissa har en anaerob metabolism, kemoheterotrofa eller kemoorganotrofa. Bildar flockar men kan under vissa tillväxtförhållanden växa som filament.	(Bernardet, Segers et al., 1996; Guo, Zhang et al., 2011)
Nitrosospira	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonadales	Betaproteobacteria	Proteobacteria	Aerobic, litoautotrof ammoniumoxiderande bakterie.	(Mobarry, Wagner et al., 1996; Norton, Klotz et al., 2008; Daims and Wagner, 2010)
Rhizobacter			Betaproteobacteria	Proteobacteria	Rhizobacter växer på rötter i jorden och kan fixera kväve.	(Vessey, 2003)
Arthrobacter					Jordbakterie som växer under aeroba förhållanden.	(Eschbach, Möbitz et al., 2003)
Proteiniclasticum	Clostridiaceae	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Strikt anaeroba, proteolytisk och fermentativ bakterie. Inget är känt om dess fysiologi i aktivt slam.	(Zhang, Song et al., 2010)
Methanosaeta	Methanosaetaeaceae	Methanocarcinales	Methanomicrobia	Euryarchaeota	Metanogener som växer under strikt anaeroba förhållanden med acetat som enda energikälla. Vanligt förekommande i anaeroba granuler.	(Harmsen, Kengen et al., 1996; Ma, Liu et al., 2006; Montero, García-Morales et al., 2009)
Smithella	Synthropaceae	Synthrobacterales	Deltaproteobacteria	Proteobacteria	Strikt anaerob bakterie. Finns ofta i metanogena miljöer.	(Liu, 1999)

En jämförelse mellan replikaten i analysen av den mikrobiella sammansättningen gjordes med multidimensionell skalning där den stora mängden data visualiseras i två dimensioner (Figur 11). PC1 står för 36,6% av skillnaden i mikrobiell sammansättning medan PC2 står för 17%. Analysen av de replikata proven från samma anläggning var mycket lika varandra, vilket tyder

på att ingen större skillnad i extraktion och PCR av proverna föreligger och att metoden är reproducerbar. Den mikrobiella sammansättningen på slamproverna i provpunkt A (prov 2) var lik provpunkt C (prov 7 och 9) med avseende på PC1 men skilde sig åt med avseende på PC2. Slamproverna från fördelningsbrunnens övre och nedre del i anläggning C var mycket lika varandra. Den mikrobiella sammansättningen i sandproverna klustrade sig väl vilket tyder på att anläggningarna innehåller en liknande mikrobiell sammansättning som skiljer sig från slammet i fördelningsbrunnen. Sandprovet från anläggning D skiljde sig något från de andra sandproverna (anläggning A, B, C, E och F). I anläggning C togs både sandprov och slamprover från fördelningsbrunnen. Den mikrobiella sammansättningen i sanden skiljde sig från sammansättningen i slamproverna i fördelningsbrunnen.



Figur 11 Multidimensionell skalning (PCoA) som visualiserar skillnader i mikrobiell sammansättning mellan de olika proverna.

3.5 Kvalité av ingående vatten till infiltrationsanläggningarna

Ingående vattnet till infiltrationsbäddarna A–F undersöktes med avseende på halten partiklar, organiskt material, fett, järn, näringsämnen, löst syre samt med avseende på temperatur och pH (Tabell 12) som mättes direkt i slamavskiljarens tredje kammare eller utloppslock och i fördelningsbrunnen samt i prover tagna från slamavskiljarens tredje kammare eller utloppslock. Mätningarna har sammanställts i Tabell 12. För flera av de undersökta parametrarna har medelvärden med hög standardavvikelse beräknats vilket tyder på en hög variabilitet bland mätvärdena.

Tabell 12 Halten partiklar, organiskt material, fett, järn, näringsämnen, löst syre samt temperatur och pH i det ingående vattnet till infiltrationsanläggningarna A–F. Koncentrationerna visas som medelvärde $\pm$ standardavvikelse; för pH visas mätintervallet, och i parentes visas antalet mättillfällen. Enheten är mg/l där inte annat är angivet. P: fosfor, N: kväve, SA: slamavskiljare, FB: fördelningsbrunn, Temp: temperatur.

Parameter	Anläggning					
	A	B	C	D	E	F
Susp material	42 $\pm$ 34 (5)	61 $\pm$ 22 (5)	149 $\pm$ 26 (4)	81 $\pm$ 44 (5)	71 $\pm$ 49 (5)	157 $\pm$ 60 (5)
Kolloider ^a [%]	0 $\pm$ 0 (3)	0 $\pm$ 0 (3)	21 $\pm$ 28 (3)	73 $\pm$ 10 (3)	18 $\pm$ 31 (3)	0 $\pm$ 0 (3)
TOC	73 $\pm$ 68 (6)	95 $\pm$ 15 (6)	265 $\pm$ 24 (6)	136 $\pm$ 28 (6)	152 $\pm$ 19 (6)	222 $\pm$ 30 (5)
BOD	138 $\pm$ 140 (6)	181 $\pm$ 18 (6)	374 $\pm$ 59 (5)	273 $\pm$ 96 (6)	300 $\pm$ 65 (6)	401 $\pm$ 44 (5)
Eterlösligt fett	27 $\pm$ 21 (3)	31 $\pm$ 10(3)	88 $\pm$ 11 (2)	68 $\pm$ 17 (3)	51 $\pm$ 13 (3)	86 $\pm$ 29 (3)
Emulgerat fett	30 $\pm$ 36 (3)	33 $\pm$ 9 (3)	60 $\pm$ 12 (2)	42 $\pm$ 18 (3)	34 $\pm$ 6 (3)	58 $\pm$ 9 (3)
Avskiljbart fett	11 $\pm$ 6 (3)	<7 $\pm$ 0 (3)	28 $\pm$ 23 (2)	26 $\pm$ 8 (3)	17 $\pm$ 9 (3)	49 $\pm$ 6 (2)
Järn i SA	0,37 $\pm$ 0,22 (4)	0,76 $\pm$ 1,2 (5)	1,74 $\pm$ 0,52 (5)	0,26 $\pm$ 0,15 (5)	0,31 $\pm$ 0,23 (5)	0,8 $\pm$ 0,3 (4)
Järn i dricksv.	0,011 (1)	0,0029 (1)	1,1 (1)	0,2 (1)	0,0023 (1)	0,012 (1)
totalt P	6,1 $\pm$ 5,5 (4)	13 $\pm$ 3 (5)	18 $\pm$ 1 (6)	11 $\pm$ 1 (5)	13 $\pm$ 2 (5)	22 $\pm$ 1 (6)
totalt N	83 $\pm$ 112 (4)	107 $\pm$ 35 (5)	150 $\pm$ 20 (6)	91 $\pm$ 5 (5)	83 $\pm$ 15 (5)	188 $\pm$ 8 (6)
C:N kvot ^b	2,1 $\pm$ 1,2 (4)	1,0 $\pm$ 0,5 (5)	1,8 $\pm$ 0,1 (6)	1,5 $\pm$ 0,3 (5)	1,9 $\pm$ 0,2 (5)	1,2 $\pm$ 0,2 (5)
Löst syre i SA	1,5 $\pm$ 1,6 (7)	0,3 $\pm$ 0,1 (6)	0,5 $\pm$ 0,2 (6)	0,4 $\pm$ 0,1 (7)	0,5 $\pm$ 0,1 (7)	0,4 $\pm$ 0,1 (6)
Löst syre i FB	1,3 $\pm$ 1,3 (5)	0,4 $\pm$ 0,2 (5)	0,3 $\pm$ 0,1 (6)	0,6 $\pm$ 0,3 (6)	0,7 $\pm$ 0,5 (6)	0,4 $\pm$ 0,0 (6)
Temp i SA [°C]	10,1 $\pm$ 2,2 (7)	13,4 $\pm$ 3,1 (6)	12,3 $\pm$ 2,1 (6)	20,7 $\pm$ 2,1 (7)	12,4 $\pm$ 3,8 (7)	14,1 $\pm$ 0,6 (6)
Temp i FB [°C]	10,3 $\pm$ 2 (5)	12 $\pm$ 2 (5)	13,7 $\pm$ 1,1 (6)	16,2 $\pm$ 2,1 (6)	13,2 $\pm$ 2,5 (6)	12,7 $\pm$ 1,9 (6)
pH []	6,2–6,5 (7)	7,4–8,3 (6)	6,7–6,8 (6)	6,8–6,9 (7)	6,8–7,2 (7)	6,9–7,2 (6)

^a andel partiklar <1,005 μ m

^b C:N kvoten beräknades genom att dividera halten TOC genom halten totalkväve

Halten suspenderat material i det utgående vattnet från slamavskiljaren var hög i vissa anläggningar (C och F) samt varierade mycket i några av anläggningarna, t.ex. anläggningar D–F (Tabell 12). I samma vatten fanns kolloider (komponenter med storlek <1,005 μ m) vid tre av anläggningarna (C–E, Tabell 12); vid alla tre mättillfällen (D), vid två av tre mättillfällen (C) och vid ett av mättillfällena (E). Vid anläggningarna A, B och F detekterades inga kolloider i utgående vattnet från slamavskiljaren (Tabell 12).

Utgående vatten från slamavskiljaren kännetecknades för alla anläggningarna genom höga koncentrationer av kväve och för vissa anläggningar också genom höga koncentrationer av BOD och fosfor (Tabell 12). Detta diskuteras i avsnitt 4.2.

Slam som bildas och/eller ackumuleras i fördelningsbrunn, spridarledningar eller infiltrationsbädden kan potentiellt leda till problem med igensättning. Orsaker till slamackumulering i dessa delar av anläggningen kan vara slamflykt från slamavskiljaren, förhöjda halter kolloider eller järn i vattnet som kan leda till utfällningar/igensättningar, eller slambildning pga för hög belastning eller ogynnsamma förutsättningar för mikroorganismer såsom syrebrist eller andra parametrar som påverkar mikroflorans funktion eller sammansättning.

4.1 Mikroflora i infiltrationssanden

Det finns enbart få tidigare studier om bakteriella samhällen i markbaserade reningsanläggningar. Dalahmeh et al (2014) undersökte bakterier i en sandkolonn som beskickades med konstgjort gråvatten och konstaterade att de dominerande klasserna var (på klassnivå) *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Sphingobacteria* vilket är i enlighet med denna studie. Inom klassen *Alphaproteobacteria* hittades framförallt *Rhizobium* men också släktet *Nitrobacter*, inom klassen *Gammaproteobacteria* hittades *Pseudomonas*, och inom klassen *Betaproteobacteria* hittades *Nitrosomonas* och *Nitrospira* (Dalahmeh, Jönsson et al., 2014). Dessutom fanns nitritoxiderande organismer av *Nitrospira* samt *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Aquabacterium* and *Rhizobium* (som är känt för att innehålla denitrifierande organismer) (Dalahmeh, Jönsson et al., 2014). I infiltrationssanden av anläggningarna A–F dominerade inte samma arter på genusnivå som i studien av Dalahmeh (2014), nämligen *Polaromonas* (*Betaproteobacteria*), *Rhodanobacter* och *Thiothrix* (*Gammaproteobacteria*) (Figur 10). Skillnaderna kan bero på att det var olika typer av vatten i studierna (gråvatten respektive avloppsvatten i denna studie).

I en annan studie om gråvattenbehandling i ett horisontellt och ett vertikalt filter visades att bakteriesammansättningen i biofilmen varierade över tid (Truu, Oopkaup et al., 2019). Efter 290 försöksdagar fanns *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria* och i det horisontella filtret även *Firmicutes*.

En amerikansk studie visade att bakterier av stammen *Proteobacteria* dominerar i infiltrationsanläggningar för avloppsvatten och att det också finns *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* och *Acidobacteria* (Tomaras, Sahl et al., 2009) vilket är generellt i enlighet med denna studie; i infiltrationssanden av anläggningarna A–F fanns också bakterier av stammarna *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* (*Sphingobacterii*) och *Actinobacteria*, men det hittades dessutom *Clostridia*.

I denna studie upptäcktes vid provtagningen av anläggning A att vatten stod i infiltrationsbädden (upp till spridarlagret). Eftersom grundvattennivån var låg kan vattnet antas ha varit avloppsvatten. Fastän PCoA analysen visade att det inte fanns relevanta skillnader i bakteriesammansättningen av biofilmen mellan bäddarna, kan ses i Tabell 9 att det fanns större andel (upp till 49%) *Betaproteobacteria* i infiltrationssanden i A än i de andra anläggningarna. Bland dessa bakterier identifierades bakterier av genus *Polaromonas* (Figur 10) vilka antas vara denitrifierande bakterier. Troligtvis var syrehalten i bädden låg på grund av den höga vattennivån så att dessa bakterier trivdes.

4.2 Slamavskiljarnas funktion

Vanliga koncentrationer i avloppsvatten efter slamavskiljning i små avloppsanläggningar är 100–300 mg/l för BOD, 4–12 mg/l för totalfosfor och 25–50 mg/l för totalkväve (Naturvårdsverket, 1991). Medelkoncentrationen av BOD var högre än intervallet i anläggningarna C, E och F, medelkoncentrationen av totalfosfor var högre i anläggningarna B, C, E och F och medelkoncentrationen av totalkväve var högre än intervallet i alla undersökta anläggningarna (jämför Tabell 12). Detta tyder på en relativt låg vattenförbrukning i hushållen vid de undersökta anläggningarna och visar att de av Naturvårdsverket och även Havs- och vattenmyndigheten publicerade riktvärdena (Naturvårdsverket, 1991; HVMFS, 2016) inte längre passar som grund till dimensionering och/eller inte är tillämpbara för anläggningar med 5 pe.

Genom sedimentering i slamavskiljaren avlägsnas mer än 70% av det suspenderade materialet vilket motsvarar en koncentration av 50–100 mg suspenderat material per liter utgående vatten under antagandet att medeldygnsförbrukningen är mellan 150–200 l per person (Naturvårdsverket, 1991). Vid anläggningarna A och B låg halten suspenderat material inom eller under detta intervall (Tabell 12) vilket tyder på att slamavskiljningen fungerade tillfredsställande. Vid anläggningarna C och F låg halten suspenderat material högre än intervallet vid alla provtagningstillfällena under provtagningsperioden. Vid anläggning D och E varierade halterna och låg över 100 mg/l vid några tillfällen (Tabell 12). De jämförelsevis höga halterna i utgående vatten kan bara delvis förklaras med en mindre utspädning pga. lägre vattenförbrukning än den som antagits av Naturvårdsverket (1991) eftersom halterna av suspenderat material i utgående vattnet inte korrelerade med halterna näringsämnen (se Tabell 12). Variationerna i halten suspenderat material efter slamavskiljaren (Tabell 12) kan därmed bero på de olika slamavskiljarnas reningseffektivitet vilken i sin tur kan ha påverkats av avloppsvattnets egenskaper. Variationerna kan inte förklaras med varierande uppehållstider av vattnet i slamavskiljaren eftersom just anläggningarna där halten suspenderat material var hög belastades bara med spillvatten genererat av två personer. Däremot finns en mätosäkerhet kopplad till resultaten då enbart stickprover togs. Enligt en rapport utgiven av Avfall Sverige anses värden av suspenderat material efter slamavskiljaren under 200 mg/l vara acceptabla i branschen (Åström, 2019). Detta värde överskreds bara av anläggning F vid ett enda mättillfälle.

Slamavskiljarnas effektivitet i att reducera halten suspenderat material korrelerar varken med halten löst syre (Tabell 12) eller med resultaten från ventilationstestet (Tabell 6) vilket betyder att det inte går att koppla en dålig funktion med en dålig ventilation baserat på dataunderlaget från denna studie.

Vid de flesta besöken hittades slam på vattenytan i slamavskiljarens sista kammare eller utloppsfack (Tabell 3). En möjlig orsak är att denitrifikation skedde i slamavskiljaren och den bildade kvävgasen gjorde att en del av slammet flöt upp. Nitrathalten i slamavskiljaren bestämdes inte men halten totalkväve var generellt hög, mellan 83 och 188 mg/l (Tabell 12). Halten löst syre varierade enbart lite och korrelerade inte med slamobservationen. Det fanns inte heller något tydligt samband mellan de uppmätta halterna av suspenderat material (Tabell 12) och slamförekomsten i slamavskiljarens sista kammare.

4.3 Partiklar och kolloider i ingående vattnet till infiltrationsanläggningarna

Om ingående vattnet till infiltrationsbädden innehåller större mängder partiklar kan det leda till igensättningar i bädden. Det fanns inget tydligt samband mellan de uppmätta halterna av sus-

penderat material i ingående vattnet (Tabell 12) och slamförekomsten i fördelningsbrunnen eller luftningsrör som observerades visuellt (Tabell 3). Det gick inte heller att se ett samband mellan slamförekomst i spridarledningar (Tabell 4) och halterna suspenderat material i ingående vattnet. Till exempel observerades mycket slam i alla anläggningsdelar vid anläggning A men halten suspenderat material i vattnet var genomgående låg. Det är möjligt att slamflykt har skett vid ett tidigare tillfälle (innan projektets mätperiod) eller det handlar om sekundär tillväxt av biomassa.

Komponenter med diameter i storleksintervallet 1-1000 nm (0,001-1 μm , ungefärligt intervall) kan vara kolloider (Ingri, 2012; Tchobanoglous, Stensel et al., 2014). Kolloidernas egenskaper gör att de inte kan sedimentera (till skillnad från partiklar) (Ingri, 2012) vilket gör att de är kvar i vattnet efter slamavskiljaren. Om vattnet innehåller många kolloider kan dessa klumpa ihop sig och potentiellt skapa igensättningar i bädden. Kolloider i avloppsvatten kan t.ex. bestå av fett, tensider eller material från hygienartiklar. I tre av de undersökta anläggningarna (A, B och F) fanns inga kolloider i utgående vattnet från slamavskiljaren vilket betyder att ingående vattnet till bäddarna i de här fallen var fritt från mycket små komponenter. Vid anläggningarna C–E fanns kolloider, vid alla tre mättillfällen (D), vid två av tre mättillfällen (C) och vid ett av mättillfällena (E). Detta visar att kolloiderna inte finns i vattnet hela tiden utan att förekomsten beror på t.ex. aktiviteter i hushållet. Det visar också att det är svårt att få en helhetsbild med avseende på kolloider för varje anläggning därför att förekomsten varierar över tid. Det är möjligt att det hade kunnat uppmätas kolloidhalter för anläggningarna A, B och F också om prover för analys av kolloider hade tagits oftare. Att andelen av kolloider i utgående vattnet från slamavskiljaren var hög (C–E) var förväntat eftersom (större) partiklar är tänkt att sedimentera i slamavskiljaren. Med det framtagna dataunderlaget går det inte att säga om förhöjda andelar kolloider leder till slamproblem i anläggningen. T ex hade anläggning A tydlig förekomst av slam i de olika anläggningsdelarna och visade tecken på igensättning (hög vattennivå i anläggningen (i spridarlagret)) men det påvisades inga kolloider i ingående vattnet (Tabell 12), möjligen därför att påkoppling av dricksvattenfiltret ledde till en utspädning av avloppsvattnet.

4.4 Inspektion av infiltrationsanläggningar

Vid tillsyn av enskilda avlopp i kommunerna behöver avloppsanläggningar inspekteras. Nedan diskuteras resultaten från denna studie med hänsyn till inspektion av infiltrationsanläggningar.

Möjligheter för effektiv kontroll av infiltrationsanläggningar med visuella observationer är begränsade. Vanligtvis inspekteras slamavskiljaren (slamförekomst, ventilation, vattennivå, t-rör med borste), fördelningsbrunnen (slamförekomst, flödesfördelning), pumpbrunn (slamförekomst), luftningsrör (förekomst av slam eller vatten) och grundvattenrör (vattennivå).

Under provtagningsperioden i detta projekt gav den visuella kontrollen mycket varierande resultat och förekomsten av ytlig slam i slamavskiljarens sista kammare eller utloppsfack och av slam i fördelningsbrunn varierade över tid i alla anläggningar förutom anläggning A. På grund av variationen var det svårt att få ett övergripande intryck inom ramen för detta projekt där vi besökte 6 anläggningar vid ca 8 tillfällen. Förekomsten av slam (Tabell 3, Tabell 4) var dessutom svårt att bedöma, t.ex. om det fanns flytslam i slamavskiljaren. Även när det förekom slam i anläggningen vid besöket var det osäkert om detta hade en inverkan på bäddens reningseffektivitet eller livslängd eftersom reningseffektiviteten inte undersöktes med mätningar.

Förekomst av vatten eller slam i luftningsrören visades inte ha betydelse. En inspektion av hela spridarledningen med hjälp av kamera visade i flera fall välfungerande ledningar fastän det fanns vatten eller slam i luftningsröret. Detta bekräftar slutsatsen som Hedin (2018) drog i sin

studie om markbaserade anläggningar, där han kom fram till att hela spridarröret måste besiktigas med rörkamera för att man skall få tillräckligt med information. Dock är det viktigt att påpeka att även en kamerainspektion inte ger tillräckligt med information för bedömning av funktionen av en infiltrationsanläggning. En viktig funktion är reduktionen av BOD och smittämnen vilket enbart kan bedömas med hjälp av provtagning av utgående vatten vilket är svårt att göra vid infiltrationsanläggningar.

Det visade sig i denna studie att det var mycket svårt att bedöma om flödet i fördelningsbrunnen var jämnfördelat mellan spridarledningarna, både genom visuell inspektion av fördelningsbrunnen och genom kamerainspektion) och om eller hur detta påverkar bäddens funktion. Dock har detta påpekats som en viktig aspekt av Sylwan et al (2017).

Avståndet mellan spridarledning och grundvattenytan gick generellt bra att mäta, dock kräver detta en inmätning av spridarledningarnas och grundvattenrörets nivå.

4.5 Igensättning

I denna studie visades att anläggning A hade problem med igensättning; slam förekom på ytan av slamavskiljarens sista kammare, i fördelningsbrunnen och luftningsrör (Tabell 3) samt spridarledningar (Tabell 4). Vid provtagning av förstärkningslagret då bädden grävdes upp observerades dessutom en hög vattennivå i bädden (i spridarlagret) trots att grundvattennivån låg i medel 76 cm under spridarledningarna. Jordarten vid anläggning A var enligt SGUs jordartskarta sandig morän dvs. tämligen genomsläpplig jord. De andra anläggningarna (B–F) visade också förekomst av slam i olika anläggningsdelar (Tabell 3) samt slam och/eller vatten i spridarledningarna (Tabell 4), men enbart vid några av besöksstillfällena. Dessa resultat visar att slamförekomst varierar mycket över tid och att det är viktigt att observera en anläggning under en period för att kunna bedöma om slamförekomsten är ett problem. Hedin (2018) drog en liknande slutsats i en studie om markbaserade anläggningar där han framhåller att förekomst av vatten och/eller slam i spridarröret inte nödvändigtvis innebär problem med bäddens funktion eller med igensättning.

Det finns olika aspekter som möjligen kan förklara igensättningsproblemen i anläggning A. I en tidigare studie indikerades att det kan ha betydelse om materialet i spridarlagret är tvättat eller ej (Sylwan, Ulinder et al., 2017). I anläggning A var det okänt om makadamen var tvättad. Vidare berättade ägaren att backspolningsvattnet från dricksvattenfiltret var påkopplat avloppet vilket vanligtvis inte rekommenderas. I en tidigare studie har visats att temperaturen kan ha en tydlig påverkan på den hydrauliska konduktiviteten (Spychala and Blazejewski, 2004). I anläggning A var den uppmätta medeltemperaturen i slamavskiljaren 10,1°C vilket var lägre än i de andra anläggningarna (Tabell 12). Detta kan möjligtvis ha haft en negativ effekt på genomsläppligheten i infiltrationsbädden. Dessutom var flödet inte jämnfördelat mellan de två spridarledningarna, det visade sig under kamerainspektionen att enbart en av spridarledningarna belastades. Slamavskiljaren i anläggning A fungerade dock effektivt, halten suspenderat material var relativt låg, i medel 42 mg/l, och järn-, fett-, BOD- och kolloidhalterna var också förhållandevis låga (Tabell 12).

Generellt kan igensättning av sand påverkas av kvoten mellan halten kol och kväve, C:N kvoten, som påverkar mikroorganismer som producerar polysackarider (Avnimelech and Nevo, 1964). Detta kan möjligtvis även ha betydelse för infiltrationsanläggningar. C:N kvoten i ingående vattnet till anläggningarna A–F beräknades (Tabell 12). Avnimelech et al (1964) testade en låg och en hög C:N kvot (0,5 och 8) och observerade att en låg C:N kvot ledde till tydlig

igensättning (minskning av den hydrauliska konduktiviteten) inom 28 dagar. C:N kvoten i ingående vattnet till anläggningarna A–F låg mellan 1,2 och 2,1 (Tabell 12) dvs. var generellt låg och varierade enbart lite. Igensättningsproblemen i anläggning A kan dock inte förklaras med C:N kvoten eftersom den högsta C:N kvoten i denna studie (2,1) uppmättes vid A (Tabell 12). Däremot uppvisade infiltrationssanden i anläggning A *Betaproteobacteria* (Figur 9). I denna bakterieklass ingår även kväveomsättande bakterier som ofta bildar kompakta kolonier som möjligen bidrar till igensättning. Dessa bakterier kan möjligen ha gynnats av C:N kvoten. Nitrifierande bakteriesläkten har dock inte identifierats i anläggning A.

När avloppsvatten infiltrerar i sand eller mark kan humus bildas i porerna där den dominanta formen som ackumulerar är huminer (Siegrist, Smed-Hildmann, R., Filip, Z.K. et al., 1991). Dessutom kan filamentformiga partiklar i avloppet vara betydligt större än porerna i sanden (Spychala, Niec et al., 2013) vilket gör att de kan bidra till igensättning. I denna studie hittades filamentväxande bakterier i fördelningsbrunnarna (prover från fördelningsbrunnen togs enbart vid anläggningarna A och C) (Figur 6, Figur 7) dock inte i proverna från infiltrationssanden.

Järnhalterna efter slamavskiljaren var högre än i dricksvattnet vid alla undersökta anläggningarna. Lösligheten av järn är mycket låg vid ett pH värde kring 7 vilket betyder att järn bildar fasta järnhydroxidpartiklar, särskilt vid närvaro av löst syre (Ingri, 2012). Eftersom de uppmätta värdena för pH låg ungefär vid 7 (Tabell 12) är det möjligt att järn har fällts ut i anläggningarna. Däremot observerades inga järnhydroxidutfällningar som har en karaktäristiskt rödbrun färg i de undersökta anläggningarna.

Sammansättningen av mikrofloran skiljde sig inte åt mellan de undersökta infiltrationsbäddarna. Generellt var biomassan i sandproverna mycket artrik. Vid en jämförelse mellan antalet sekvensvarianter mellan de olika proverna kunde ingen stor skillnad uppvisas. I alla proverna var förekomsten av bakterieklasserna *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Sphingobacterii*, *Actinobacteria* och *Deltaproteobacteria* dominerande.

Funktionen av slamavskiljaren skiljde sig mellan de undersökta anläggningarna, halten suspenderat material varierade mellan 42 ± 34 och 157 ± 60 mg/l. Slamavskiljarnas effektivitet i att reducera halten suspenderat material korrelerade varken med halten löst syre eller med resultaten från ventilationstestet vilket betyder att det inte går att koppla en dålig funktion med en dålig ventilation baserat på dataunderlaget från denna studie. De höga halterna BOD, fosfor och kväve i utgående vattnet från slamavskiljarna tyder på en relativt låg vattenförbrukning i hushållen.

Det fanns inget tydligt samband mellan de uppmätta halterna av suspenderat material i ingående vattnet till infiltrationsanläggningen (efter slamavskiljaren) och slamförekomsten i fördelningsbrunnen, luftningsrör eller spridarledningar. Förekomsten av kolloider i ingående vattnet varierade över tid.

Under provtagningsperioden i detta projekt gav den visuella kontrollen mycket varierande resultat och förekomsten av slam i slamavskiljare och fördelningsbrunn varierade över tid i alla anläggningar förutom anläggning A, vilket gjorde att det var svårt att få ett övergripande intryck inom ramen för detta projekt där vi besökte 6 anläggningar vid cirka 8 tillfällen.

I denna studie visades endast en anläggning ha problem med igensättning (slam förekom på ytan av slamavskiljarens sista kammare, i fördelningsbrunnen, luftningsrör samt spridarledningar och det fanns en hög vattennivå i bädden, upp till spridarlagret). Vid denna anläggning var koncentrationen suspenderat material, järn, fett och BOD låga. Dock var det okänt om materialet i spridarlagret var tvättat, men backspolningsvattnet från dricksvattenfiltret var påkopplat avloppet, vattentemperaturen i ingående vattnet var relativt låg ($10,1^{\circ}\text{C}$) och bara en av spridarledningarna belastades (dock bara av två personer).

De uppmätta kol:kväve (C:N) kvoter i ingående vattnet till de undersökta anläggningarna låg mellan 1,2 och 2,1 dvs. var relativt låga vilket i tidigare studier har visats främja igensättning av sand. Halterna järn och fett kunde inte ses vara problematiska.

Filamentformiga partiklar i avloppsvattnet kan bidra till igensättning. I denna studie hittades filamentväxande bakterier i två fördelningsbrunnar dock inte i proverna från infiltrationssanden.

Järnhalterna efter slamavskiljaren var högre än i dricksvattnet vid alla undersökta anläggningarna. Däremot observerades inga järnhydroxidutfällningar som har en karaktäristiskt rödbrun färg i de undersökta anläggningarna.

I framtida studier skulle det kunna undersökas om det finns skillnader i den bakteriella sammansättningen av avloppsvatten vid olika anläggningar. Dessutom skulle infiltrationsanläggningar kunna följas upp under längre tid med fokus på genomsläpplighet eller kloggning. Havererade anläggningar skulle kunna undersökas med hänsyn till sammansättningen av biohuden/slammet i bädden. Dessutom skulle faktorer som påverkar den hydrauliska konduktiviteten kunna undersökas närmare.

- Aruga, S., Kamagata, Y., Kohno, T., Hanada, S., Nakamura, K., Kanagawa, T., 2002. Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(4), 1309-1316.
- Åström, J., 2019. Slamtömning med tvåfacksbil - Mindre mängd att transportera och behandla - bättre miljö. Avfall Sverige rapport 2019:02. , 1-55.
- Avnimelech, Y. and Nevo, Z., 1964. Biological clogging of sands. *Soil Sci.* 98(4), 222-226.
- Bernardet, J. -, Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., 1996. Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(1), 128-148.
- Daims, H. and Wagner, M., 2010. The microbiology of nitrogen removal. IWA Publishing, London, UK.
- Dalahmeh, S. S., Jönsson, H., Hylander, L. D., Hui, N., Yu, D., Pell, M., 2014. Dynamics and functions of bacterial communities in bark, charcoal and sand filters treating greywater. *Water Res.* 54, 21-32.
- Edgar, R. C., 2016. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*, Preprint.
- Edgar, R. C. and Flyvbjerg, H., 2015. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 31(21), 3476-3482.
- Edgar, R. C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19), 2460-2461.
- Eschbach, M., Möbitz, H., Rompf, A., Jahn, D., 2003. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: Anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 223(2), 227-230.
- Eveborn, D., Kong, D., Gustafsson, J. P., 2012. Wastewater treatment by soil infiltration: Long-term phosphorus removal. *J. Contam. Hydrol.* 140–141(0), 24-33.
- Ginige, M. P., Keller, J., Blackall, L. L., 2005. Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12), 8683-8691.

- Guo, F., Zhang, S. -, Yu, X., Wei, B., 2011. Variations of both bacterial community and extracellular polymers: The inducements of increase of cell hydrophobicity from biofloc to aerobic granule sludge. *Bioresour. Technol.* 102(11), 6421-6428.
- Hagman, M., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Jansen, J. I. C., 2008. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge-identification of bacteria and process activity studies. *Water Res.* 42(6-7), 1539-1546.
- Harmsen, H. J. M., Kengen, H. M. P., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M., De Vos, W. M., 1996. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5), 1656-1663.
- Hedin, J., 2018. Markbaserad rening - en studie av funktion i fält. *Vatten* 74(1-2), 27-45.
- HVMFS, 2016. Havs- och vattenmyndighetens allmänna råd om små avloppsanordningar för hushållsspillvatten. HVMFS 2016:17.
- Ingri, J., 2012. Från berg till hav - en introduktion i miljögeokemi. Studentlitteratur, Lund.
- Johansson, B., 2002. Small-scale wastewater treatment (Småskalig avloppsrening - En exemplarsamling), in: Anonymous Formas, Stockholm. In Swedish.,
- Kozich, J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., Schloss, P. D., 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(17), 5112-5120.
- Larsen, P., Nielsen, J. L., Otzen, D., Nielsen, P. H., 2008. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(5), 1517-1526.
- Larsson, C., Forsberg, B., Engström, T., 2017. Check-up of on-site wastewater treatment facilities. Report on two projects. (Uppföljande kontroll av nya små avloppsanläggningar. Redovisning av LOVA-projekten Metodutveckling för uppföljande besök av nya enskilda avloppsanläggningar & Bra små avlopp med koll på grundvattnet.) In Swedish. Kungsbacka Municipality
- Larsson, R., 2008. Jords egenskaper. Statens geotekniska institut Information 1, 1-58.
- Liu, J. R., Burrell, P., Seviour, E. M., Soddell, J. A., Blackall, L. L., Seviour, R. J., 2000. The filamentous bacterial morphotype "Nostocoida limicola" I contains at least two previously described genera in the low G+C gram positive bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 23(4), 528-534.
- Liu, Y., 1999. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(2), 545-556.

- Ma, K., Liu, X., Dong, X., 2006. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(1), 127-131.
- McIlroy, S. J., Starnawska, A., Starnawski, P., Saunders, A. M., Nierychlo, M., Nielsen, P. H., Nielsen, J. L., 2016. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environ. Microbiol.* 18(1), 50-64.
- McIlroy, S. J., Saunders, A. M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A. A., Karst, S. M., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., 2015. MiDAS: The field guide to the microbes of activated sludge. Database 2015
- Miljösamverkan Halland, 2016. Final report: On-site sanitation with phosphorus filters - Results from inspection and sampling. (Slutrapport: Små avlopp med fosforfälla. DEL 1. Resultat från tillsyn och provtagning av små avlopp med fosforfälla.) In Swedish. Miljösamverkan Hallan och miljösamverkan Västra Götaland. , 1-41.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., Stahl, D. A., 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6), 2156-2162.
- Montero, B., García-Morales, J. L., Sales, D., Solera, R., 2009. Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: Use of fluorescent in situ hybridization. *Waste Manage.* 29(3), 1144-1151.
- Naturvårdsverket, 2003. Små avloppsanläggningar - hushållsspillvatten från högst 5 hushåll. Allmänna råd 87:6. Naturvårdsverket Fakta. Naturvårdsverket, Stockholm.
- Naturvårdsverket, 1991. Allmänna råd 91:2. Rening av hushållsspillvatten. Infiltrationsanläggningar och markbäddar för fler än 25 personer.
- Nielsen, P. H., Aquino de Muro, M., Nielsen, J. L., 2000. Studies on the in situ physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environ. Microbiol.* 2(4), 389-398.
- Norton, J. M., Klotz, M. G., Stein, L. Y., Arp, D. J., Bottomley, P. J., Chain, P. S. G., Hauser, L. J., Land, M. L., Larimer, F. W., Shin, M. W., Starkenburg, S. R., 2008. Complete genome sequence of *Nitrosospora multififormis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(11), 3559-3572.
- Olshammar, M., Ek, M., Rosenquist, L., Ejhed, H., Sidvall, A., Svanström, S., 2015. Up-date on state of the art and statistics for on-site sanitation systems (Uppdatering av kunskapsläget och statistik för små avloppsanläggningar). Report number 166. In Swedish. SMED SvenskaMiljöEmissionsData Report number 166, 1-34.
- Palm, O., Malmén, L., Jönsson, H., 2002. Robusta, uthålliga små avloppssystem (Robust and sustainable small waste waste treatment systems) (in Swedish).
- Siegrist, R. L., Smed-Hildmann, R., Filip, Z. K., Jenssen, P. D. (1991) Humic substance formation during wastewater infiltration. In: 6. National Symposium on Onsite Waste-water Treatment, St. Joseph, MI (United States), 16-17 Dec 1991. Report no CONF-911254-2, DE92000045. 1-10.

- Spychala, M., Niec, J., Pawlak, M., 2013. Preliminary study on filamentous particle distribution in septic tank effluent and their impact on filter cake development. *Environ. Technol.* 34(20), 2829-2837.
- Spychala, M. and Blazejewski, R., 2004. Sand filter clogging by septic tank effluent. *Water Sci. Technol.* 48(11-12), 153-159.
- Swedish Standards Institute, 2005a. Water quality - Determination of suspended solids - Method by filtration through glass fibre filters. EN 872:2005.
- Swedish Standards Institute, 2005b. Water quality - Determination of phosphorus - Ammonium molybdate spectrometric method. SS-EN 6878:2005, chapter 7.
- Swedish Standards Institute, 1992. Geotechnical tests - Particle size distribution - Sieving. SS 027123.
- Sylwan, I., Ulinder, E., Eveborn, D., Eriksson, B., 2017. Funktion hos markbaserade reningsanläggningar i fält. Uppdragsrapport. RISE - Biovetenskap och material/Jordbruk och livsmedel
- Tchobanoglous, G., Stensel, H. D., Tsuchihashi, R., Burton, F., Abu-Orf, M., Bowden, G., Pfrang, W., 2014. *Wastewater Engineering - Treatment and Resource Recovery*, Fifth Edition, Metcalf & Eddy / AECOM. McGraw-Hill Education, New York.
- Tomaras, J., Sahl, J. W., Siegrist, R. L., Spear, J. R., 2009. Microbial diversity of septic tank effluent and a soil biomat. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10), 3348-3351.
- Truu, M., Oopkaup, K., Krustok, I., Kõiv-Vainik, M., Nõlvak, H., Truu, J., 2019. Bacterial community activity and dynamics in the biofilm of an experimental hybrid wetland system treating greywater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26(4), 4013-4026.
- Vessey, J. K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255(2), 571-586.
- Wendehorst, R., 1998. *Bautechnische Zahlentafeln: mit 225 Beispielen*. Utgiven av Ott W. Wetzell. B.G. Teubner, Stuttgart, Germany.
- Zhang, K., Song, L., Dong, X., 2010. *Proteiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(9), 2221-2225.