

Desinfeksjon av vann i fiskeoppdrett - faktorer som påvirker fiskepatogene bakteriers følsomhet overfor UV-bestråling

Av Helge Liltved
og Bjarne Landfald

Helge Liltved er forsker ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA) og Bjarne Landfald er førsteamanuensis ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.

Sammendrag

Ultrafiolett (UV) lys i UV-C området benyttes i utstrakt grad for desinfeksjon av vann i landbasert fiskeoppdrett. Ved standard dose/respons-studier er det vist at de fleste fiskepatogene mikroorganismer er følsomme for UV-bestråling. Resultater fra våre laboratorieforsøk viser imidlertid at fiskepatogene bakterier som *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* og *Yersinia ruckeri* har evne til effektiv reparasjon av UV-skade ved fotoreaktivering i nærvær av synlig lys og "liquid holding recovery" (LHR) i mørke. Lys- og mørkereparasjon, individuelt eller i kombinasjon, økte organismenes toleranse for UV-lys dramatisk (3 til 7 ganger høyere dose for 99.9% inaktivering) i forhold til ved normal mørkeinkubering. Disse mekanismene bør derfor tas hensyn til ved dimensjonering av UV-anlegg i oppdrettsammenheng.

Når *A. salmonicida* ble eksponert for UV og klor i kombinasjon, ble det registrert en inaktiveringseffekt som var

mindre enn additiv i forhold til summen av de individuelle inaktiveringshastighetene for de to metodene. Kombinasjonen UV/jod resulterte i minst additiv effekt i begge vanntypene som ble benyttet (en bufferløsning og avløpsvann fra et landbasert oppdrettsanlegg). Ved individuell bruk av klor eller jod var det nødvendig å doble dosene for å oppnå samme effekt som ved kombinasjon med UV-bestråling. Ingen økt inaktivering ble observert i buffer når ozon ble benyttet i kombinasjon med UV, sammenliknet med effekten av ozon alene.

UV dose-respons kurvene for *A. salmonicida* i partikkelfri bufferløsning og i avløpsvann som inneholdt 22 mg/l suspendert stoff var nesten identiske, med 99.9 % reduksjon i løpet av henholdsvis 48 og 50 sekunder. Den lille forskjellen i effekt ble knyttet til den noe høyere UV-absorbansen i avløpsvannet enn i bufferløsningen, og ikke til beskyttelse som følge av interaksjoner mellom bakterie-celler og partikulært materiale.

Summary

Our work demonstrate that the fish pathogenic bacterial species of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* og *Yersinia ruckeri* are capable of efficient repair of UV-damage. The observed recovery was attributed to "liquid holding recovery" (LHR) in pure buffer-solution in the absence of visible light and photoreactivation in the presence of visible light. Recovery processes, individually or in combination, increased the 99.9% inactivation dose 3 to 7 times compared to the dose required when plated immediately after UV-exposure. It is concluded that the potential of fish pathogenic bacteria for recovery should be taken into consideration when assessing the efficiency of UV disinfection of aquacultural water.

When *A. salmonicida* was exposed to the combined action of UV irradiation and chlorine, a less than additive effect was observed as compared with the sum of individual death rates by the two treatments. The corresponding UV/iodine combination gave at least additive effect in both the water qualities tested (a buffer-solution and a wastewater from a land-based fish farm). No increment in inactivation rate in buffer-solution was observed when ozone was used in combination with UV, as compared with ozone alone.

The UV inactivation profiles of *A. salmonicida* in particle-free buffer-solution and in wastewater containing 22 mg/l suspended solid were almost identical, with 99.9 % reduction in viability after 48 and 50 seconds, respectively. Higher UV-absorbance in wastewater

than in buffer-solution seems to be the main reason for the slightly higher survival, rather than protection by adsorption or embedding in particles.

Innledning

I landbaserte akvakultur-anlegg kan det være aktuelt med desinfeksjon av både inntaksvann og avløpsvann som smitteforebyggende tiltak. Når det gjelder avløpsvann, er det spesielt viktig å forhindre spredning av smitte til nærliggende sjøanlegg fra slakterier for oppdrettsfisk og fra laboratorier som benyttes til smiteforsøk.

For å begrense risikoen for sykdomsutbrudd i norske settefiskanlegg forårsaket av bakterier og virus assosiert med laksefisk, har det i lengere tid vært restriksjoner på bruk av sjøvann eller ferskvann fra kilder med oppgang av anadrom fisk. Imidlertid gir "Forskrift om desinfeksjon av inntaksvann til oppdrettsanlegg for akvatiske organismer" av 12.02.91 fra Landbruksdepartementet åpning for bruk av slikt vann dersom godkjent desinfisering benyttes. Det kreves godkjenning av metode, typegodkjenning av utstyr og godkjenning av selve installasjonen på oppdrettsanlegget. Pr. idag er UV-anlegg fra 5 leverandører typegodkjent, og det er installert og godkjent UV-enheter ved ca. 100 norske settefiskanlegg, med dimensjonerende kapasiteter fra 500 til 30 000 liter/min. Det er i tillegg installert 4 store ozonanlegg for desinfeksjon av ferskvanninntak.

Produksjon av settefisk for utsett i sjøanlegg krever mye vann, fortrinnsvis ferskvann, men også sjøvann. Mu-

ligheten til å bruke sjøvann i settefiskproduksjonen vurderes som svært viktig av oppdretterne. Dette for 1) å nøytralisere surt vann og gi beskyttelse mot pH/Al toksisitet i områder av landet hvor slike tiltak er nødvendig. 2) Øke ionestyrken og derved bedre de osmotiske forholdene med påfølgende redusert energiforbruk og økt vekst hos fisken. Sjøvannsinnblanding har også gitt bedring av sykdomsbildet f.eks. ved gjellebetennelse. 3) Sjøvannstilvenning kan gi jevnere smoltifisering, redusert sorteringsbehov, sikrere leveringstidspunkt og betydelig redusert dødelighet ved utsetting i sjøvann. 4) Mulighet til å opprettholde nødvendig vannmengde i anlegg som periodevis har lite ferskvann tilgjengelig, og å oppnå en temperatargevinst vinterstid med lav ferskvannstemperatur.

Utvikling av nye typer UV lamper (mer effektive lavtrykks- og mellomtrykkslamper med lengre levetid), reaktorer med forbedrede hydrauliske utforminger, og forbedrede styrings- og overvåkingssystemer gjør at UV-desinfeksjon av store vannmengder kan forsvares kostnadmessig. Denne utviklingen åpner for bruk av UV-teknologi for mikrobiologisk kontroll også i landbaserte matfiskanlegg, både i anlegg for laksefisk og marin fisk.

Det er flere fordeler ved å bruke UV lys i UV-C området for desinfeksjon av inntaksvann sammenliknet med andre metoder. Det dannes ikke forbindelser som er giftige for fisk og skaldyr ved normal bestråling av naturlig ferskvann og sjøvann /14/. Andre desinfeksjonsmidler, som halogener og ozon, er svært

giftige for fisk i lave konsentrasjoner /21/. Disse kan også danne reaksjonsprodukter (oksidanter) i sjøvann som er giftige. I tillegg til selve desinfeksjonstrinnet kreves derfor et ekstra behandlingstrinn for fjerning av restkonsentrasjoner og reaksjonsprodukter før vannet kan ledes til oppdrettsorganismene.

For å sikre effektiv inaktivering av fiskepatogene mikroorganismer, er det av avgjørende betydning at deres følsomhet for UV-lys er kjent. Under laboratoriebetingelser er de fleste fiskepatogene bakterier og virus følsomme for UV lys. Det er vist at UV-doser fra 1.5 til 3.5 mWs/cm² inaktiverer fiskepatogene bakterier som *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* og *Aeromonas salmonicida* med 99.9% /9, 17/, sammenliknet med 4 til 10 mWs/cm² for tarmbakterier fra mennesker eller varmblodige dyr /1, 6/. Imidlertid kan enkelte dobbelttrådig RNA virus framvise ekstrem UV-toleranse, som f.eks. viruset som forårsaker infeksjøs pankreas nekrose (IPNV) i laksefisk /9, 17/

Enkelte utenlandske forfattere har imidlertid sådd tvil om effekten av UV desinfeksjon i oppdrettsystemer p.g.a. dårlige erfaringer fra praktisk bruk /16, 19/. Manglende oppnåelse av ønsket bakteriologisk standard på behandlet vann er tilskrevet feildimensjonering grunnet manglende kunnskap om målorganismenes UV-følsomhet. Nødvendig UV-dose for en bestemt grad av inaktivering blir normalt fastsatt ved laboratorieforsøk hvor målorganismen blir eksponert for ulike doser og umid-

delbart inkubert på egnet vekstmedium i mørke. Slik praksis er ugunstig for bakterien med tanke på reparasjon av UV-skader, noe som kan resultere i en overestimert følsomhet for de aktuelle dosene.

Naturlige vannkvaliteters partikkelinnhold og UV-absorbans kan påvirke effekten av bestrålingen. Likeledes kan viltlevende bakteriestammer ha annen overflatestruktur enn laboratoriestammer, noe som kan innvirke på evnen til adhesjon til hverandre og til partikler. Bakterier med svært hydrofob overflate vil kunne autoagglutinere (klumpe seg) i vandig løsning.

Fiskepatogene mikroorganismers følsomhet ovenfor ulike desinfektanter er blitt undersøkt med støtte i form av et utdanningstipend fra Norges forskningsråd. Et sammendrag av resultatene fra forsøkene med UV-bestråling blir presentert i det følgende. Forsøkene er mer detaljert beskrevet i internasjonal faglitteratur (9, 10, 11, 12).

Noen faktorer som påvirket overlevelse etter UV-bestråling

UV-reparasjon

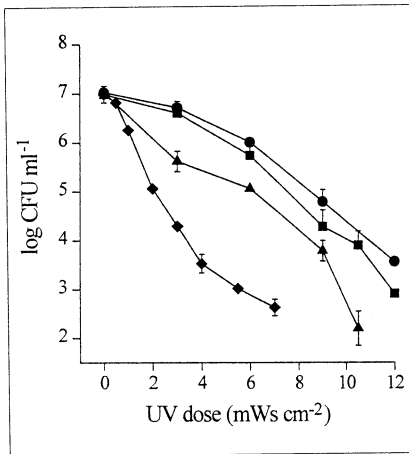
“Liquid holding recovery” (LHR) og fotoreaktivering er to reaktiveringsmekanismer som kan gi betydelig økt overlevelse i UV-bestrålte bakterier. Effekten av LHR er vist i *Escherichia coli* ved å holde denne i næringsfritt vann noen timer mellom bestråling og utplating. Reparasjonsmekanismen er vist å være “excision repair”, altså enzymatisk fjerning av den skadde DNA-sekvensen og replikering v.h.a. den kom-

plementære og intakte DNA-tråden / 18/. Ved å eksponere bestrålte bakterier for synlig lys i området 330 - 480 nm vil et enzym (DNA fotolyase) aktiveres som kan reparere den skadde DNA-sekvensen uten å fjerne denne /20/. Det er vist at flere bakterier fra ulike miljøer (inkludert *E. coli*) har evne til effektiv fotoreparasjon.

Hensikten med studiene som vi gjennomførte var å undersøke betydningen av LHR og fotoreparasjon, enkeltvis og i kombinasjon, i forhold til overlevelse av utvalgte fiskepatogene bakterier etter UV-bestråling /10, 11/.

Som vist i figur 1, var nødvendig dose for 99.9% inaktivering av *A. salmonicida* 3.2 mWs/cm² ved standard dose/responsmåling. Ved inkubasjon i næringsfri buffer i 48 timer før utplating krevdes tilsvarende en dose på 8.1 mWs/cm². 9.5 mWs/cm² var nødvendig etter 6 timers fotoreaktivering og 10.6 mWs/cm² ved fotoreaktivering fulgt av LHR. Evne til LHR og fotoreaktivering ble også observert for *V. anguillarum* og *Y. ruckeri*. Ved å kombinere de to behandlingene ble det registrert intervaller med lav eller ingen sensitivitet for økende UV-doser for disse bakteriene. For fullført LHR krevdes fra 48 timer til mer enn 72 timer ved 22°C, mens 4 til 6 timer ved 1500 lx var tilstrekkelig for maksimal fotoreaktivering.

Effekten av reparasjonsmekanismer har generelt sett ikke blitt tillagt vekt ved praktisk bruk av UV-lys for desinfisering av drikkevann, avløpsvann og vann i oppdrettsystemer. I norske settefiskanlegg brukes store mengder vann (kort



Figur 1. Dose-respons kurver for UV-bestrålt (254 nm) *A. salmonicida* etter ulike reaktiveringer. Alle inkuberinger ble gjort ved 22°C. Symboler: ◆, direkte utplating og mørk-inkubering; ▲, LHR i mørke i 48 timer; ■, belysning ved 1500 lux på agarskåler i 6 timer; ●, belysning i buffer etter-fulgt av LHR. Stolpe-symbolene representerer standardavvik av 3 til 5 parallelle forsøk.

oppholdstid i kar) med temperaturer normalt under 15°C. Dette tilsier liten effekt av LHR i settefiskproduksjon. I systemer med høyere temperaturer og/eller lavere vanngjennomstrømning kan situasjonen være anderledes. Dette gjelder også ved UV-desinfeksjon av avløpsvann, hvor LHR kan foregå i resipienten og derved resultere i økt overlevelse og negative miljøeffekter.

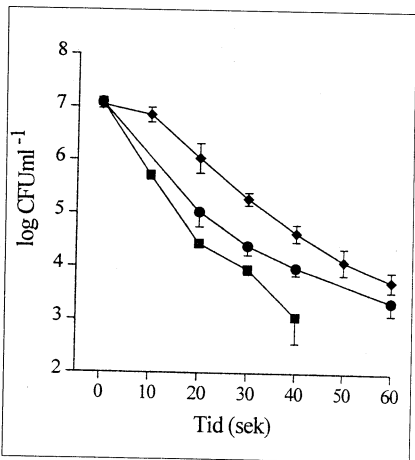
Effekten av fotoreaktivering i settefiskanlegg bør imidlertid tas i betraktning, da 10 til 1000 ganger økt overlevelse ble observert etter 2 timer med 1500 lx reaktiverende lys. I de tilfeller der det benyttes utendørs kar som ek-

sponeres for direkte sollys, vil reparasjonen trolig foregå atskillig hurtigere. Ved å eksponere UV-bestrålte *E. coli* og halofile bakterier til slike intensiteter, har komplett fotoreaktivering blitt registrert i løpet av brøkdeler av en time /3, 5/. Enkelte patogene bakterier har som tidligere nevnt hydrofobe egenskaper og evne til å akkumulere i vannets overflatelag i oppdrettskarene /4/. Dette kan medføre økt oppholdstid og økt eksponering til fotoreaktiverende kunstig lys eller sollys.

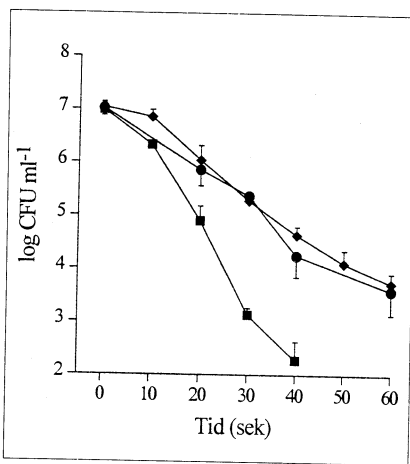
UV i kombinasjon med andre desinfeksjonsmidler

UV-bestråling kombinert med kjemiske desinfeksjonsmidler kan være et alternativ for bredspektret effekt overfor fiskepatogener, og for å utnytte eventuelle synergistiske effekter. Slike effekter kan bli oppnådd ved fotolyse av kjemikalier til reaktive sekundære fotooksideranter. Kombinert bruk av ozon og UV-lys har blitt gitt mye oppmerksomhet, både som et middel for oksidasjon av organiske forurensninger i vann og for økt desinfeksjonseffekt. Kombinert bruk av halogener og UV har ikke oppnådd samme interesse innen vannbehandling. Jagger /8/ beskriver imidlertid jod som en potensiell "sensitizer" ved UV-bestråling av levende celler. Ved å UV-behandle klorert vann kan OCl og HOCl fotolyses til primære reaktive mellomprodukter, som igjen blir omdannet til sekundære fotooksideranter /13/.

I våre forsøk ble kombinasjonene UV/klor, UV/jod og UV/ozon utprøvd på en laboriestamme av *A. salmonicida* i



Figur 2. Dose-respons kurver for inaktivering av *A. salmonicida* i avløpsvann ved 7°C med klor og UV-bestråling, individuelt og i kombinasjon. Symboler: ♦, UV-bestråling (intensitet = 0.05 mW/cm² ved 254 nm); ●, klorering med 2.0 mg/l; ■, UV/klor i kombinasjon. Stolpesymbolene representerer standard-avvik av 3 til 5 parallelle forsøk.



Figur 3. Dose-respons kurver for inaktivering av *A. salmonicida* i avløpsvann ved 7°C med jod og UV-bestråling, individuelt og i kombinasjon. Symboler: ♦, UV-bestråling (intensitet = 0.05 mW/cm² ved 254 nm); ●, jod-dosering med 2.6 mg/l; ■, UV/jod i kombinasjon. Stolpe-symbolene representerer standard-avvik av 3 til 5 parallelle forsøk.

bufferløsning og i avløpsvann fra et oppdrettsanlegg /12/. Ved å anta første ordens kinetikk ble inaktiveringshastighetene i området 0 til 99.9% inaktivering beregnet for de forskjellige behandlingene. Kombinasjonen UV/klor resulterte i økt inaktiveringshastighet i begge vanntypene i forhold til de samme behandlingene enkeltvis, men ikke tilstrekkelig til å overgå summen av de individuelle hastighetene. Effekten var med andre ord mindre enn additiv (Figur 2). Kombinert bruk av UV og jod resulterte i mer enn additiv effekt i buffer og additiv effekt i avløpsvann sammenliknet med individuelle behandlinger (Figur

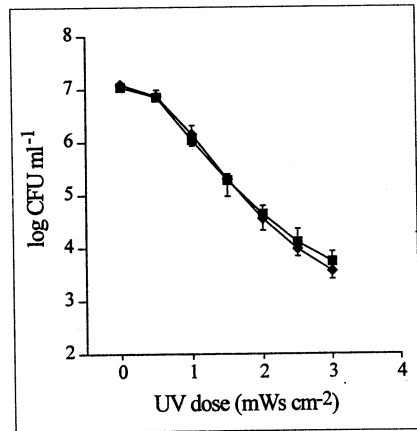
3). For å oppnå tilsvarende effekt i avløpsvann med kun klor eller jod som med UV/klor og UV/jod, var det nødvendig å doble mengdene av de respektive halogenene. For avløp hvor det ansees som nødvendig å benytte halogener for desinfeksjon, vil det være mulig å redusere doseringene og dermed oppnå en viss miljøeffekt ved å installere UV-bestråling som tilleggshandling. Dette kan være aktuelt ovenfor mikroorganismer med høy UV-toleranse og relativt lav halogentoleranse, som f.eks. IPN-virus. Ingen økt inaktiveringshastighet ble observert ved kombinert bruk av UV og ozon i buffer.

Slik antagonistisk effekt er også rapportert i andre undersøkelser og kan forklares med at UV-lys raskt bryter ned ozon til mindre baktericide forbindelser, primært hydrogenperoksid /7/. Ved lave eller manglende restkonsentrasjoner av ozon kan den videre spaltningen av hydrogenperoksid til reaktive OH-radikaler være ubetydelig.

Partikkelinnhold og evne til aggregering

Fiskepatogene bakterier har evne til å overleve i oligotrofe miljøer, og kan benytte adhesjon til partikler som en strategi for bl.a. å bedre næringstilgangen under slike forhold /2/. Det er også vist at plankton i sjøvann kan være bærere av sykdomsbakterier. Assosiering til partikulært materiale kan gi beskyttelse mot UV-bestråling og dermed økt overlevelse, noe som er vist for koliforme bakterier ved bestråling av rensert kommunalt avløpsvann /15/. Det ser ut til at det kreves en form for kolonisering av partikkeloverflaten eller innbaking i partiklen dersom beskyttelse skal oppnås.

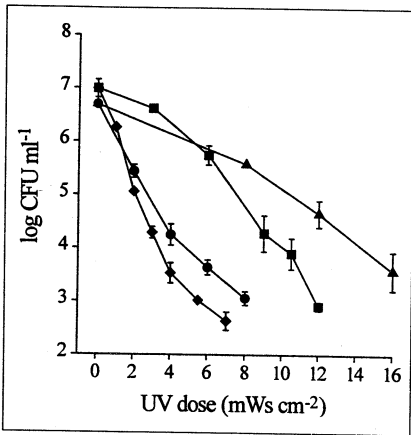
Under turbulente forhold i vann med god UV-transmisjon vil forhøyet partikkelinnhold i seg selv ikke nødvendigvis gi effektiv beskyttelse, noe som ble bekreftet i våre forsøk, hvor partikkelholdig avløpsvann fra et oppdrettsanlegg ble tilsatt bakterier og bestrålt med ulike doser under omrøring /12/. Laboratoriestammen av *A. salmonicida* viste liten forskjell i respons mellom dette vannet og partikkelfri bufferløsning (Fig. 4). De små forskjellene i overlevelse som ble observert kan til-



Figur 4. Dose-respons kurver for UV-inaktivering av *A. salmonicida* i ulike vanntyper ved 7°C. Symboler: ◆, inaktivering i buffer-løsning; ■, inaktivering i avløpsvann inneholdende 22 mg/l suspendert stoff. Stolpe-symbolene representerer standard-avvik av 3 til 5 parallelle forsøk.

skrives den noe høyere UV-absorban- sen i avløpsvannet enn i det partikkel- frie vannet.

I andre forsøk utført i buffer ble det benyttet en virulent stamme av *A. salmonicida* (AL2017) med hydrofobe overflateegenskaper kjent for å auto-agglutinere i vandig løsning. Forsøket ble utført for å undersøke betydningen av aggregering i forhold til UV-følsomhet. Etter 3 timers sakte omrøring av bakteriesuspensjonen ble det påvist aggregering og økt overlevelse etter UV-eksponering med og uten fotoreaktivering, sammenliknet med overlevelse av uaggregerte celler (Fig. 5). Dette ble forklart med at aggregerte celler oppnår en viss grad av beskyttelse sammenliknet med enkelt-celler.



Figur 5. Dose-respons kurver for UV-inaktivering av *A. salmonicida* i bufferløsning ved 7°C med og uten aggregering og fotoreaktivering. Symboler: ◆, direkte utplating og mørkinkubering; ●, aggregering ved omrøring i 3 timer før bestråling; ■, belysning ved 1500 lux i 6 timer på agarskåler; ▲, aggregering etterfulgt av belysning. Stolpe-symbolene representerer standardavvik av 3 til 5 parallelle forsøk.

Referanser

1. Chang J.C.H., Ossoff S.F., Lobe D.C., Dorfman M.H., Dumais C.M., Qualls R.G. & Johnson J.D. (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1361-1365.
2. Dawson M.P., Humphrey B.A. & Marchall K.C. (1981). Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Current Microbiology* 6:195-199.
3. Eker A.P.M., Formenoy L. & de Wit L.E.A. (1991). Photoreactivation in the

extreme halophilic archaebacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Photochemistry and Photobiology* 53, 643-651.

4. Enger Ø., Gunnlaugsdottir B., Thorsen B.K. & Hjeltnes B. (1992). Infectious load of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* during the initial phase of a cohabitant infection experiment with Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 15:425-430.

5. Harm W. (1966). The role of host-cell repair in liquid-holding recovery of UV-irradiated *Escherichia coli*. *Photochemistry and Photobiology* 5, 747-760.

6. Harris G.D., Adams V.D., Sorensen D.L. & Curtis M.S. (1987). Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. *Water Research* 21, 687-692.

7. Hoigne J. (1988). The chemistry of ozone in water. In: *Process Technologies for Water Treatment* (ed. by S. Stucki), pp. 121-141. Plenum Press, New York.

8. Jagger J. (1967). *Introduction to research in ultraviolet photobiology*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

9. Liltved H., Hektoen H. & Efraimssen H. (1995). Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering*, 14, 107-122.

10. Liltved H. & Landfald B. (1993). UV inactivation and photoreactivation

- of bacterial fish pathogens. In: Fish Farming Technology (ed. by H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen & K. Tvinnereim) pp. 77-83, A.A. Balkema, Rotterdam.
11. Liltved H. & Landfald B. (1995a). Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria. Water Research, submitted for publication.
 12. Liltved H. & Landfald B. (1995b). Use of alternative disinfectants, individually and in combination, in aquacultural wastewater treatment. Aquaculture Research 26, 567-576.
 13. Nowell L.H. & Hoigne J. (1992). Photolysis of aqueous chlorine at sunlight and ultraviolet wavelengths - II. Hydroxyl radical production. Water Research 26, 599-605.
 14. Oliver B. G. & Carey J. H. (1976). Ultraviolet disinfection: an alternative to chlorination. Journal of Water Pollution Control Federation 48, 2619-2624.
 15. Qualls R.G., Flynn M.P. & Johnson J.D. (1983). The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. Journal of Water Pollution Control Federation 55, 1280-1285.
 16. Rosenthal H. (1993). The history of recycling technology: A lesson learned from past experience. In: Fish Farming Technology (ed. by H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen & K. Tvinnereim), pp. 341-349. A.A. Balkema, Rotterdam.
 17. Sako H. & Sorimachi M. (1985). Susceptibility of fish pathogenic viruses, bacteria and fungus to ultraviolet irradiation and the disinfectant effect of U.V.-ozone water sterilizer on the pathogens in water. Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture 8, 51 -58 (In Japanese with English summary).
 18. Swenson P.A. (1976). Physiological responses of *Escherichia coli* to far-ultraviolet radiation, p. 269-387. Photochemical and photobiological reviews, vol. 1. (ed. by K.C. Smith) Plenum Press, New York.
 19. Tamplin M.L. & Capers G.M. (1992). Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of gulf coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. Applied and Environmental Microbiology 58, 1506-1510.
 20. Walker G.C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews 48, 60-93.
 21. Ward R. W. & De Graeve G. M. (1978). Residual toxicity of several disinfectants in domestic wastewater. Journal of Water Pollution Control Federation 50, 46-60.