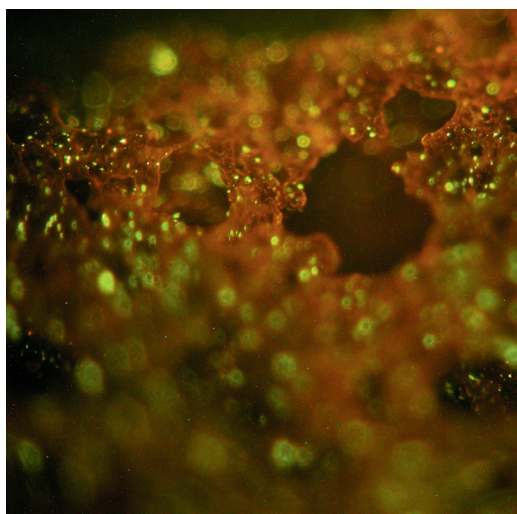
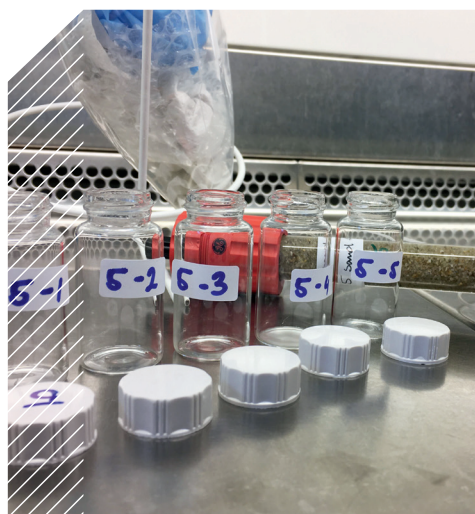


Udvikling af biologiske starter- produkter til vandværksfiltre



UDVIKLING AF BIOLOGISKE STARTER- PRODUKTER TIL VANDVÆRKSFILTRE

DATO: 13. december 2019

Projekt ID:

86.2016

Udgiver:

DANVA

Udarbejdet af:

Tina B. Bech, GEUS

Finansiering:

Rapporten er finansieret af
VUDP, Vandsektorens Udviklings- og Demonstrationsprogram

Samarbejdspartnere:

Esben Sejer Boetius, KLAR Forsyning
Sarah Christensen, HOFOR
Florian Wagner, Krüger
Tina Bech, Jens Aamand, GEUS

Kategori (Spildevand, drikkevand eller klimatilpasning):

Drikkevand

Indholdsfortegnelse

1	Sammenfatning	3
2	English summary	4
3	Introduktion	5
3.1	Marked og/eller anvendelsesmuligheder	6
3.2	Næste skridt	7
3.3	Formidlingsplan	7
4	Projektet	8
4.1	Formål	8
4.2	Output	8
4.3	Projektresultater	8
4.4	Konklusion	24
5	Litteraturliste	25

1 Sammenfatning

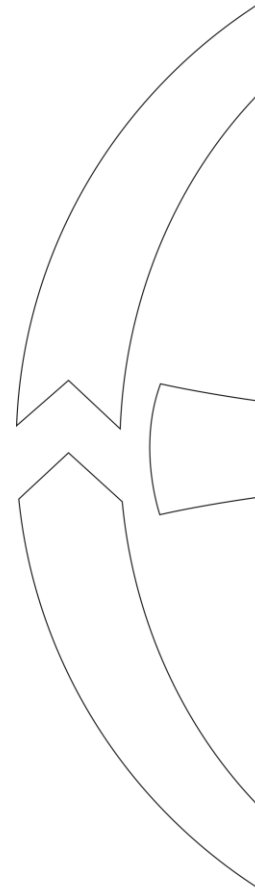
Formålet med BIO2BOOST2 har været at frembringe et robust, billigt og hygiejnisk podemateriale, som kan bruges i forbindelse med opstarten af nye biologiske filtre til drikkevandsproduktion. Målet var, at opstartstiden for biofiltre skulle reduceres fra typisk 2 – 3 måneder til 2 - 4 uger ved tilsætning af podemateriale svarende til et volumen på under 2 % af det samlede filtermateriale.

Der er blevet udført forsøg på laboratorieskala, pilotskala og fuldskala.

- I laboratoriet blev tre filtermaterialer sand, anthrazit og Filtralite® podet med et nitrifiserende bakterie konsortium og sammenlignet i kolonneforsøg. Resultaterne viste, at omsætningen af ammonium var uafhængig af de tre materialer, hvorimod der blev observeret en højere koncentration af nitrit for behandlingen med sand.
- I pilotskalaforsøg blev opstarten af nye filtre sammenlignet for henholdsvis podet Filtralite® og eksisterende filtersand fra Køge vandværk. Det eksisterende filtersand havde en tydelig positiv effekt på ammonium fjernelsen, hvorimod det podede Filtralite® ingen effekt havde, sammenlignet med en kontrol kolonne uden podning. På det eksisterende filtersand var koncentrationen af bakterier ca. 100 gange større, hvilket sandsynligvis er årsagen til resultatet.
- Under fuldskala forhold på Køge Ny Vandværk blev podet sand og podet Filtralite® sammenlignet. Allerede efter 4 uger var ammonium-koncentration under grænseværdien for drikkevand både i filtre med og uden podemateriale. Der blev ikke observeret en positiv effekt ved tilsætning af podemateriale. Dette kan skyldes en generel lav koncentration af ammonium i råvandet på under 0,5 mg/L.

Den generelt hurtige opstart i både pilot og fuldskala kan dog have skjult en eventuelt positiv effekt af starterkulturen på ammonium-omsætningen. Det vil derfor være hensigtsmæssigt også at teste metoden på et vandværk, hvor der forventes en langsom opstartstid. Desuden, vil det være vigtigt at øge antallet af bakterier på podematerialet.

Projektet har været et samarbejde mellem KLAR og HOFOR vandforsyning, Krüger A/S, som er en national og international vandværksrådgiver/leverandør og GEUS som forskningsinstitution.



2 English summary

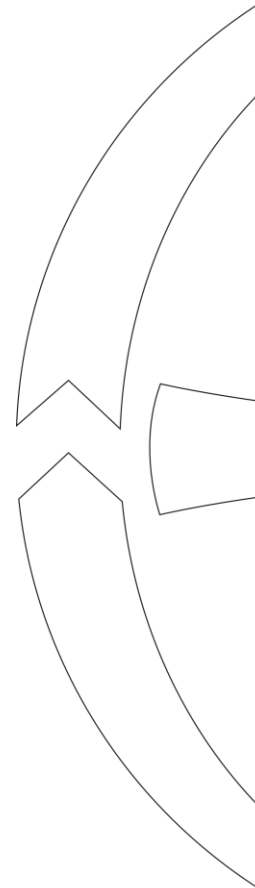
The purpose of BIO2BOOST2 has been to develop a solid, inexpensive and hygienic inoculated filter material, which can be used for decreasing start-up time of new biological granular media filters. The aim of the project was to reduce the time from the typical 2 – 3 months to 2 – 4 weeks by adding a filter material that had been inoculated by nitrifying bacteria. The total volume of added inoculated material should remain under 2 % of the total volume of filter material.

Experiments were conducted at laboratory, pilot and full-scale:

- In the laboratory, three inoculated filter materials (sand, Filtralite® and anthrazit) were compared in small column experiments. The results revealed that the removal of ammonia was unaffected by the treatments, whereas for nitrite there was observed a higher concentration in the sand treatment.
- At pilot scale, the effect on the start-up time was compared for new filters, with added inoculated Filtralite® and with added filter material taken from the existing Køge waterworks. Existing filter material revealed a positive effect on the ammonia removal, whereas no effect was seen from inoculated Filtralite® as compared to the control column which received no inoculated material. The bacterial concentration on the existing filter material was approximately 100 times higher compared to the inoculated Filtralite, and is the most likely reason behind the results.
- At full-scale at Køge new waterworks inoculated sand and inoculated Filtralite® were compared. We found that within four weeks the ammonia concentration was below the Danish drinking water guideline of 0.05 mg NH₄⁺/L for filters with or without inoculated filter material. There was not observed any significant positive effect from the inoculated treatments. The concentration of ammonia varied throughout the experiment, but was generally lower than 0.5 mg/L. For 3 out of 7 measurements, it was even below 0.1 mg/L. The low ammonium loading rate was most likely a contributing factor for, that the filter met the regulatory limit of 0.05 mg/L relatively fast.

The relatively rapid startup of the filters could have hidden a potential positive effect from the inoculated filter material. It would therefore be beneficial to test this setup at waterworks with an anticipated slower startup. In addition, it would be important to increase the total number of bacteria on the inoculated filter material.

The project has been a collaboration between KLAR and HOFOR water supplies, Krüger A/S and GEUS.

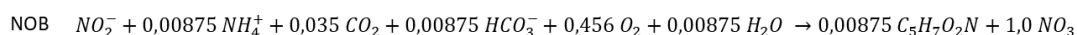
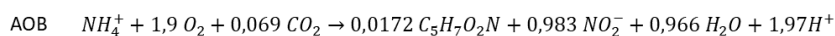


3 Introduktion

I Danmark indvindes størstedelen af vores drikkevand fra grundvandet, og derfor er der flere steder et stort træk på grundvandsressourcerne. I dette projekt er det blevet undersøgt nærmere, hvorvidt det er muligt at reducere opstartstiden af nye sandfiltre, som typisk er forbundet med et stort forbrug af råvand, som almindeligvis ledes til afløb eller recipient, indtil vandkvalitetskravene for drikkevand er opfyldte. Den normale procedure ved indkøring af et nyt sandfilter, er at lede råvand til filteret, og efterfølgende vente på, at filtermaterialet naturligt koloniseres af råvandets mikroorganismer. Dette er en forholdsvis langsom proces, der influeres af koncentrationen af bakterier i råvandet samt de betingelser råvandets sammensætning giver bakterierne, og vandværkets filterdrift under opstartsperioden.

Inden vandet kan udledes til forbrugeren skal det leve op til drikkevandskriterierne. I Europa er den maksimale grænseværdi 0,5 mg NH₄/L og 0,1 mg NO₂/L, men i Danmark har man skærpet grænseværdierne yderligere til 0,05 mg NH₄/L og 0,01 mg NO₂/L. Disse grænseværdier er nødvendige, for at undgå mikrobiel vækst i distribueringsystemet, som kan resultere i fjernelse af ilt, akkumulering af toksisk nitrit (NO₂), dårlig lugt og smag samt korrosion (Zhang *et al.*, 2009).

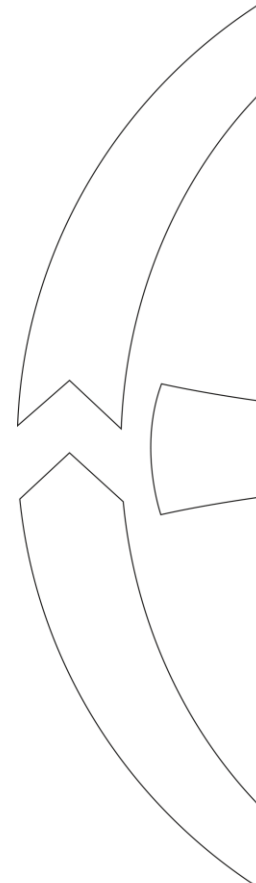
Oxidationen af ammonium sker ved nitrifikation, som klassisk set er en to-trins bakteriel proces, hvor ammonium omdannes til nitrit og efterfølgende til nitrat (Figur 1). Oxidationen af ammonium til nitrit udføres hovedsageligt af en gruppe bakterier, som samlet kaldes AOB (ammonium oxiderende bakterier). Den efterfølgende oxidation af nitrit til nitrat udføres tilsvarende af en gruppe bakterier, som kaldes NOB (nitrit oxiderende bakterier). Nyere studier har dog fundet, at der findes bakterier, som kan oxidere ammonium til nitrat i et trin, disse kaldes comammox bakterier, og er klassificeret i gruppen *Nitrospira* (Daims *et al.*, 2016).



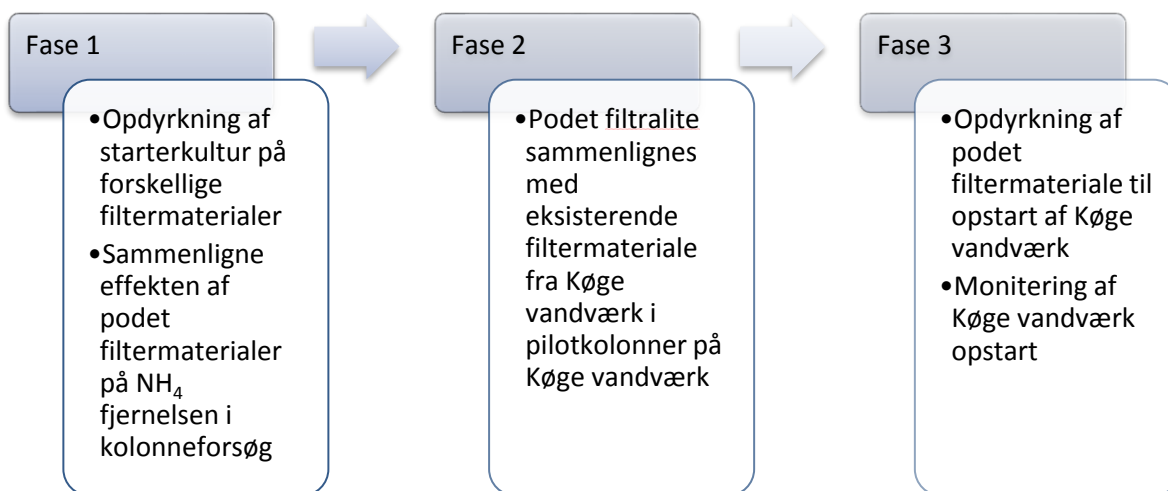
Figur 1. Nitrifikation opdelt på to reaktioner, hvor 1 mg ammonium giver 0,2 mg AOB biomasse og 0,1 mg NOB biomasse (Zhang *et al.*, 2009).

Det er et velkendt problem, at opstarten af nye filtre kan tage fra uger til måneder – og i sjældne tilfælde lykkedes det ikke at etablere nitrifikationsprocessen i filteret. Bakteriel oxidation af ammonium via nitrit til nitrat er en relativ simpel og udbredt proces i filtre. Alligevel, er den svær at kontrollere, og derfor er det vanskeligt at forudsige hvor lang tid opstarten af et vandrensingsfilter tager. Graham *et al.* (2007) beskriver biologisk nitrifikation som uforudsigelig og skrøbelig som følge af det mutualistiske forhold mellem AOB og NOB, hvor en akkumulering af toksisk nitrit kan have en negativ effekt på det bakterielle samfund i filtret.

Idéen bag BIO2BOOST2 har været at udvikle en naturlig biologisk starterkultur til drikkevandsfiltre, som kan sikre en stabil, effektiv, hurtig og repetérbar opstart af omsætningen af ammonium, nitrit og mangan i nye sandfiltre. Ved at forkorte opstartstiden vil der være store økonomiske besparelser. Projektet har været en fortsættelse af BIO2BOOST projektet, hvor der blev udviklet en starterkultur, som reducerede opstartstiden af filterkolonner i pilot-skala med ca. 10 dage ved at tilsætte 4,5% podet filtermateriale af det samlede filter volumen (Albers *et al.*, 2018; Sørensen, 2017).



Projektgruppen har bestået af 1) KLAR og HOFOR vandforsyning, der kender til de praktiske udfordringer og vandværksdrift; 2) Krüger, som er en national og international vandværksrådgiver/leverandør, der kan arbejde med forretnings- og eksportmuligheder, og 3) GEUS som forskningsinstitution med en stærk viden indenfor miljøbioteknologi og mikrobiologi i grund- og drikkevand. I projektet var følgende faser planlagt: Opformering og forbedring af starterkulturer i laboratoriet, pilotforsøg, løbende myndighedsinformation og -behandling samt fuldskalaforsøg på Køge nyt Vandværk (Figur 2).



Figur 2. Projektaktiviteterne inden for BIO2BOOST2 opdelt i tre faser, hhv.: laboratorieforsøg (fase 1), pilotforsøg (fase 2) og fuldskalaforsøg (fase 3).

3.1 Marked og/eller anvendelsesmuligheder

Der findes ca. 2500 vandværker i Danmark, hvoraf 5-10 % årligt renoveres eller etablerer nye drikkevandsfiltre. Hvis den gennemsnitlige indkøringstid kan reduceres fra de typiske 2-3 måneder, vil dette være til gavn for grundvandsressourcen og økonomien i Forsyningerne.

Overlagsmæssigt spildes i Danmark 5 – 10 millioner m^3 drikkevand årligt til indkøring af renoverede eller nye drikkevandsfiltre. Samtidig anslås forbrugt ca. 1 mio. kWh årligt i denne indkøringsperiode samt et ikke kendt antal mandskabstimer, som kan nyttiggøres bedre i Forsyningerne.

På nuværende tidspunkt findes der ikke et produkt som kan afhjælpe denne uforudsigelige opstart af vandværker. I dette projekt blev der ikke vist en effekt af tilsat podemateriale. Dette kan dog skyldes, at forholdene i Køge var for optimale, og at effekten af behandlingen derfor udeblev.

3.2 Næste skridt

I dette projekt er vi ikke kommet en mulig løsning nærmere, men det videre fremtidige arbejde kunne indbefatte:

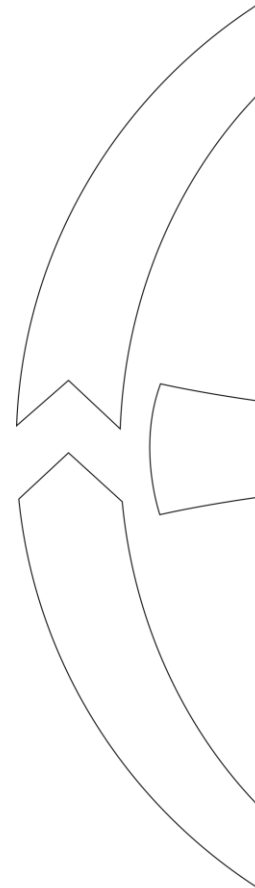
- Teste den udviklede metode af på flere vandværker.
- Optimere det bakterielle konsortium med fokus på højere koncentration samt sammensætningen af disse bakterier.
- Sammenligne råvandet fra vandværker med og uden opstartsproblemer med hensyn til f.eks. bakteriesammensætning og koncentration, uorganiske parametre og grundvandsgeologi, for herigennem bedre at kunne forstå de faktorer, som påvirker opstartstiden.

3.3 Formidlingsplan

Projektet har været præsenteret i nedenstående medier:

- Artikel i Danskvand, februar 2018, side 38-39.
- Præsentation ved Dansk Vandkonference 13-14 november, 2018, ved Florian Wagner, Krüger.
- Præsentation ved Vandforum, 24 april 2019, ved Tina Bech, GEUS.

Grundet manglende effekt af den udviklede biologiske starterkultur, er der i projektgruppen ikke planer om yderligere præsentationer af Bio2Boost2.



4 Projektet

4.1 Formål

Formålet med BIO2BOOST2 har været at frembringe et robust, billigt og hygiejnisk podemateriale, som var testet og klart til produktion og salg i det danske og internationale drikkevandsmarked. Målet var, at opstartstiden for biofiltre skulle reduceres fra typisk 2 – 3 måneder til 2 - 4 uger ved tilsætning af et podet filtermateriale svarende til et volumen på under 2 % af det samlede filtermateriale.

4.2 Output

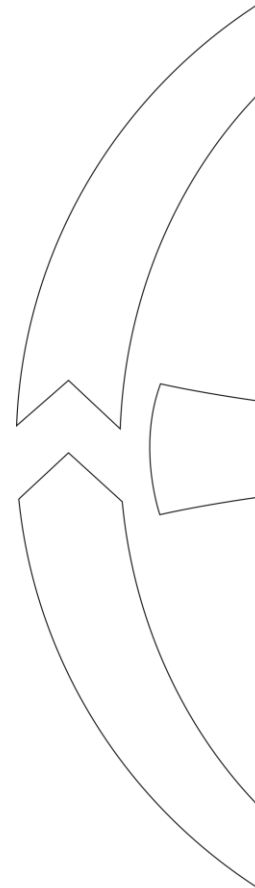
Outputtet af projektet skulle have været en opkoncentrering af relevante hurtigtvoksende nitrificerende bakterier (f.eks. *Nitrosomonas*, *Candidatus Nitrotoga* og *Nitrospira*) på filtermateriale, som kunne reducere opstartstiden. Dette podemateriale ilægges filteret med nyt filtermateriale lige inden opstart. I opstartsfasen vil denne gruppe af hurtigt voksende bakterier både kolonisere filteret samt omsætte ammonium og nitrit til nitrat, mens filteret langsomt koloniseres af den mere langsomt voksende *Nitrospira*, som over tid bliver den mest dominerende bakterie i filteret, da denne har en konkurrence fordel i det næringsfattige miljø i filteret.

Teoretisk burde kvantiteten af nitrificerende bakterier på podematerialet svare til et sparet volumen råvand. Derfor har koncentrationen af nitrificerende bakterier i råvandet sandsynligvis stor betydning for effekten af podematerialet samt en general opstartstid. På nuværende tidspunkt forelægger et podemateriale, som mangler yderlig udvikling.

4.3 Projektresultater

4.3.1 Sammenligning af filtermateriale

Forsyningernes vandrensingsfiltre består hovedsageligt af traditionelle filtermaterialer som sand, men anthrazit bruges også nogen steder. Et nyere alternativ hertil er Filtralite®, som fremstilles ved at opvarme ler til 1200°C, hvorved der sker en ekspansion og en afbrænding af organisk materiale. Det meget porøse materiale resulterer i et stort overfladeareal sammenholdt med sand og anthrazit. Tabel 1 giver en oversigt over de tre filtermaterialer, som er brugt i dette projekt.



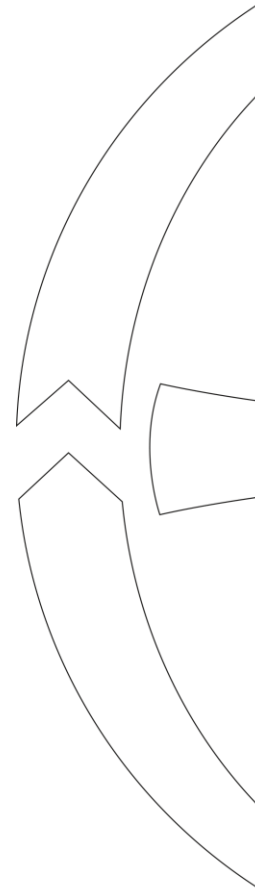
Tabel 1. Oversigt over de tre typer af filtermateriale.

	Oprindelse	Densitet	Størrelse
		g/cm ³	Mm
Filtralite®	Ler	0,57	1,5-2,5
Anthrazit	Kul	0,84	1,4-2,5
Sand	Kvarts	1,75	0,8-1,4

For at kunne vurdere om de tre filtermaterialer havde en forskellig indvirkning på koloniseringen af bakterier på partiklernes overflade samt hvorvidt der var en varierende vedhæftning, og herved øget risiko for udvaskning fra filteret, er disse tre filtermaterialer sammenlignet ved følgende forsøg:

- Opdyrkning over 60 dage i sterile flasker, hvor de tre filtermaterialer blev sammenlignet ved I) omsætning af ammonium og nitrit, II) kolonisering af overfladen, og III) kvantificering af AOB og NOB.
- De tre podede filtermaterialer testedes derefter under flow i små kolonner, hvor koncentrationen af ammonium, nitrit og nitrat blev fulgt løbende.

Opdyrkning af nitrificerende bakterier sker ved brug af et klassisk ammonium mineral medie (AMM), som er brugt i en række forsøg (Krymmel and Harms, 1982; Spieck *et al.*, 2006). Dette medie indeholder vigtige uorganiske forbindelser, som er nødvendig for nitrifikationen og herigennem opbygning af AOB og NOB biomassen. Fra det tidligere BIO2BOOST projekt blev koncentrationen af ammonium reduceret til 1/10 af den oprindelige opskrift, heraf navnet 1/10 AMM opløsning (Figur 3). Denne reduktion skyldtes et ønske om at opdyrke bakterier, som trives ved lave koncentrationer af ammonium. Koncentrationen svarer til 18 mg NH₄/L.



Composition of the ammonium-containing mineral medium for enrichment of nitrifiers and production of the "biosand"

Medium stock solution

NH ₄ Cl	54.0 mg (1 mM)
KH ₂ PO ₄	54.4 mg (0.4 mM)
KCl	74.4 mg (1.0 mM)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	49.3 mg (0.2 mM)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	147.0 mg (1.0 mM)
NaCl	584.0 mg (10.0 mM)

Trace elements solution	1.0 ml
Distilled water	ad 1000 ml

Trace elements solution:

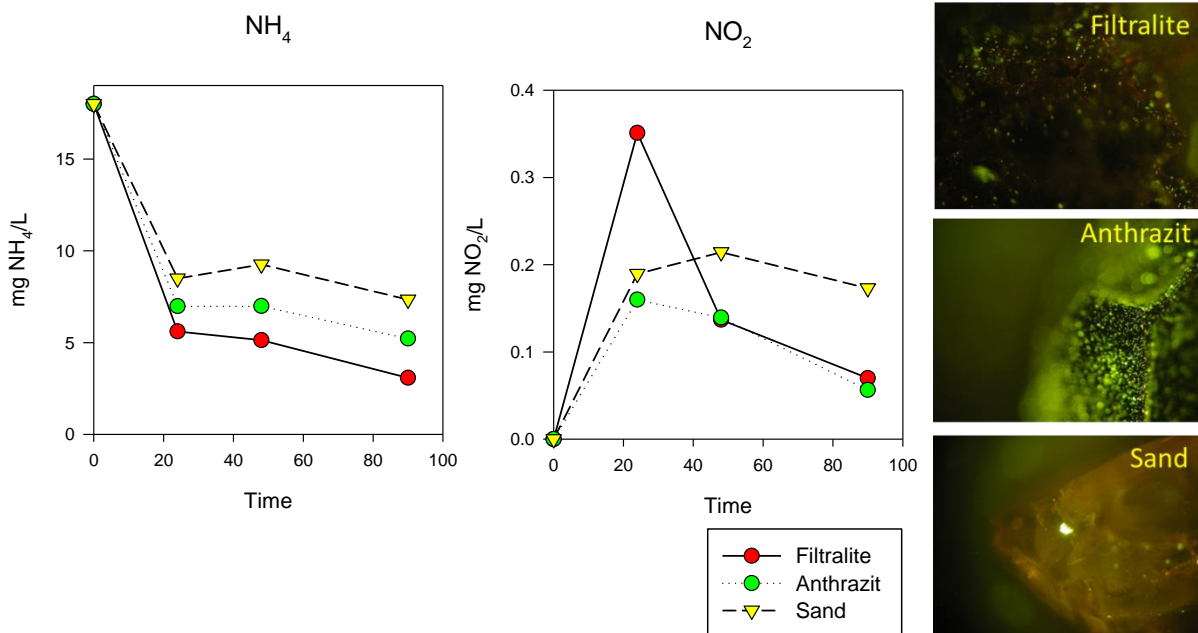
MnSO ₄	0.02	mM
H ₃ BO ₃	0.8	mM
ZnSO ₄	0.15	mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.03	mM
FeSO ₄	3.5	mM
CuSO ₄	0.1	mM
HCl	0.025	N

Figur 3. Sammensætningen af 1/10 AMM mineral medie til dyrkning af nitrificerende starterkulturer.

Indledningsvist blev der taget udgangspunkt i det podede sand, som blev udviklet fra filtermateriale fra Islevbro vandværk i det tidligere BIO2BOOST projekt. Dette havde stået ved 10°C i ca. et år, hvorefter der blev tilsat nyt 1/10 AOB opløsning. I første omgang var der en langsom omsætning, men denne blev gradvist hurtigere ved gentagne tilsætninger af nyt medie.

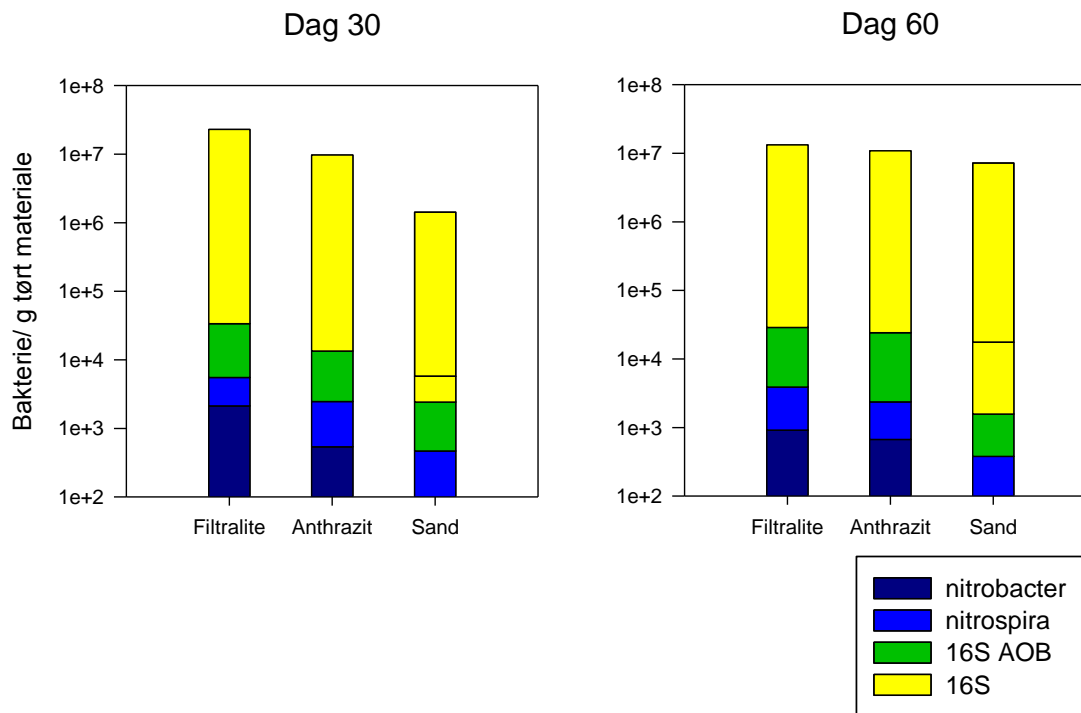
For at kunne sammenligne de tre filtermaterialer, blev der opsat triplikat batchforsøg i 250 mL sterile blue-cap flasker. Hver flaske indeholdte 3 g inokuleret kvartssand og 27 g Filtralite[®], anthrazit eller sand samt 100 mL 1/10 AMM opløsning. Der blev løbende tilsat ny 1/10 AMM opløsning i takt med omsætningen fra ammonium og nitrit til nitrat. Efter 30 og 60 dage blev der udtaget en lille delprøve fra flaskerne, som blev brugt til at visualisere bakterier på overfladen (Figur 4) samt kvantificere AOB og NOB (Figur 5). Desuden blev omsætningshastigheden sammenlignet efter 60 dage (Figur 4).

Omsætningen af ammonium og nitrit efter 60 dage afhang af filtermaterialet. I Figur 4 ses den største fjernelse af ammonium med Filtralite[®] efterfulgt af henholdsvis anthrazit og sand. Grundet den største ammonium fjernelse ved Filtralite[®] sås også en midlertidigt nitrittop ved dette materiale, hvorimod de andre to filtermaterialer forblev under ca. 0,2 mg NO₂/L. For sand forblev koncentrationen af nitrit højere sammenlignet med anthrazit og Filtralite[®]. Desuden, kan det hurtige fald i ammonium også skyldes en sorption til filtermaterialet.



Figur 4. Sammenligning af starterkulturen på de tre filtermaterialer: Filtralite[®], anthrazit og sand, hvor I) fjernelse af NH₄ og NO₂ fra 1/10 AOB mediet er afbilledet inden for 100 timer. II) Bakterier på overfladen af de tre filtermaterialer er afbilledet med fluorescens mikroskopi efter 60 dages opdyrking med 1/10 AMM opløsning.

Fjernelsen af nitrit afhæng af mængden af NOB, og som det ses i Figur 5, var koncentrationen af NOB (*Nitrobacter* og *Nitrospira*) efter 60 dage netop mindre for sand. Specielt koncentrationen af *Nitrobacter* adskilte sig fra de to andre materialer, hvilket indikerer, at denne gruppe af bakterier kan være vigtig for fjernelsen af lavere nitrit koncentrationer.

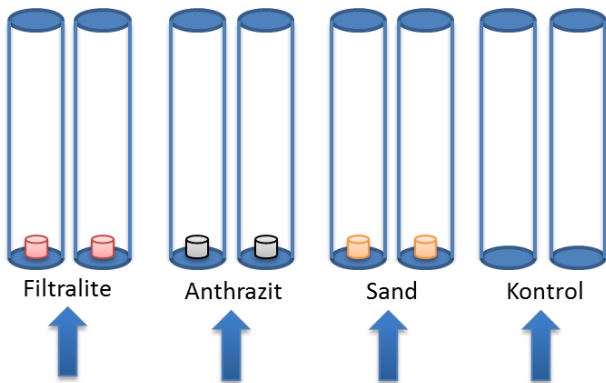


Figur 5. Koncentrationen af AOB, NOB (*Nitrobacter* + *Nitrospira*) og total antal bakterier (baseret på qPCR under antagelse af et gen per celle) på henholdsvis Filtralite®, anthrazit og sand efter 30 og 60 dages opdyrkning på 1/10 AMM.

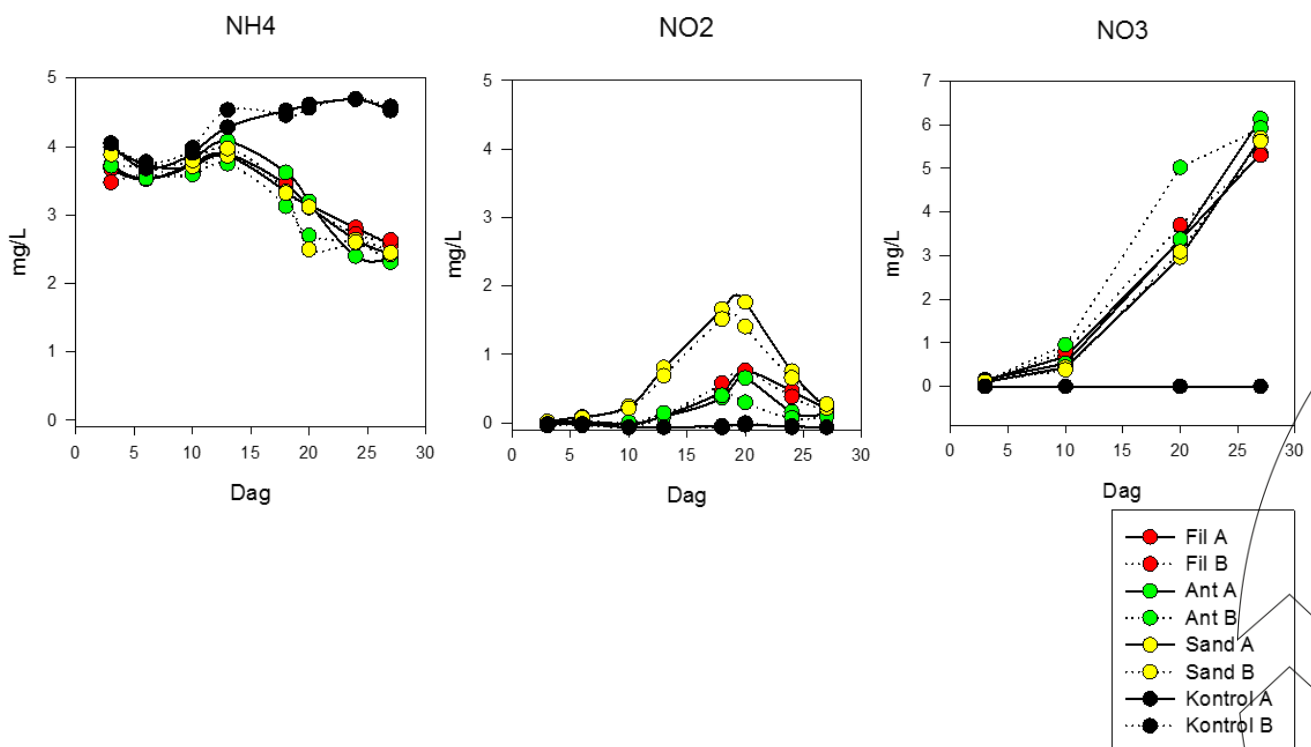
Under opdyrkingen af nitrificerende bakterier ses i Figur 5, at størstedelen af bakterierne ikke tilhører de to grupper AOB og NOB, som de er defineret i dette setup. 16S kvantificeringen dækker alle bakterier, og er udregnet under den antagelse, at der kun er et 16S gen i hver bakterie. For de tre materialer ses, at det totale antal bakterier er mellem 10^6 og 10^7 bakterie/g tørt materiale. For AOB er koncentrationen varierende fra ca. 5000 til 50.000 AOB bakterier/g efterfulgt af henholdsvis *Nitrospira* og *Nitrobacter*. Den større opformering af AOB kan forklares ved, at der dannes ca. dobbelt så meget biomasse i omdannelsen af ammonium til nitrit sammenholdt med omdannelsen af nitrit til nitrat (Figur 1).

Kvantificeringen af gener er baseret på taqman qPCR med følgende primersæt: 16S (1369f, 1492r) (Suzuki *et al.*, 2000), 16S AOB (CTO 189 A/B/C) (Hermansson and Lindgren, 2001), *Nitrospira* (Nspra-675, Nspra-746) (Graham *et al.*, 2007) og *Nitrobacter* (Nitro-1198, Nitro-1423) (Graham *et al.*, 2007).

Efter de 60 dages opformering blev de tre nitrificerende bakteriesamfund yderligere testet i et laboratorie-baseret kolonnesystem med kvartssand (h20 x Ø1.6 cm) ved 10°C og et konstant flow på 4,8 mL/h, hvilket svarede til en opholdstid på ca. tre timer. Kolonnerne blev tilført 2 % podet filtermateriale (volumen) ved indløb, og nitrifikationen blev efterfølgende fulgt gennem 27 dage ved kvantificering af ammonium, nitrit og nitrat koncentrationen i udløbet (Figur 6 og 7).



Figur 6. Forsøgssetup i kolonner pakket med nyt sand, hvor de tre podet materialer (Filtralite®, anthrazit og sand) blev sammenlignet i duplikat. Podemateriale svarende til 2 % af kolonnens volumen blev placeret ved kolonnens indløb; de to kontrolkolonner indeholdt kun sand.



Figur 7. Omsætning af 1/10 AMM (yderligere 6X fortyndet), hvor koncentrationen af ammonium, nitrit og nitrat sammenlignes for fire behandlinger i duplikater: podet Filtralite® (Fil A, Fil B), podet anthrazit (Ant A, Ant B), podet sand (Sand A, Sand B) og en kontrol (ikke podet).

Indløbskoncentrationen af ammonium varierede fra 3,5 til 4,5 mg/L, hvilket skyldtes usikkerheder omkring afvejning og yderligere fortynding af 1/10 AMM opløsningen (Figur 3). I udløb sås, at ammonium koncentrationen var ens uanset hvilket podemateriale, som blev

brugt. For nitrit sås der en højere koncentration ved behandlingen med sand sammenlignet med Filtralite og anthrazit. Som tidligere beskrevet kan dette skyldes, at sand har en relativ lavere andel af NOB i forhold til AOB (Figur 5).

Generelt set var der kun små forskelle i ammoniumkoncentrationen i udløbet mellem de enkelte filtermaterialer. Dette er i modsætning til opdykningsfasen, hvor der var en hurtigere fjernelse af ammonium ved behandlingen med Filtralite®. Denne effekt kunne dog ikke ses i de efterfølgende kolonneforsøg. En mulig forklaring er, at i kolonneforsøgene er den podet mængde filtermateriale baseret på volumen, og ikke vægt som under opdykningen, hvilket giver en lavere bakterietæthed i kolonnerne.

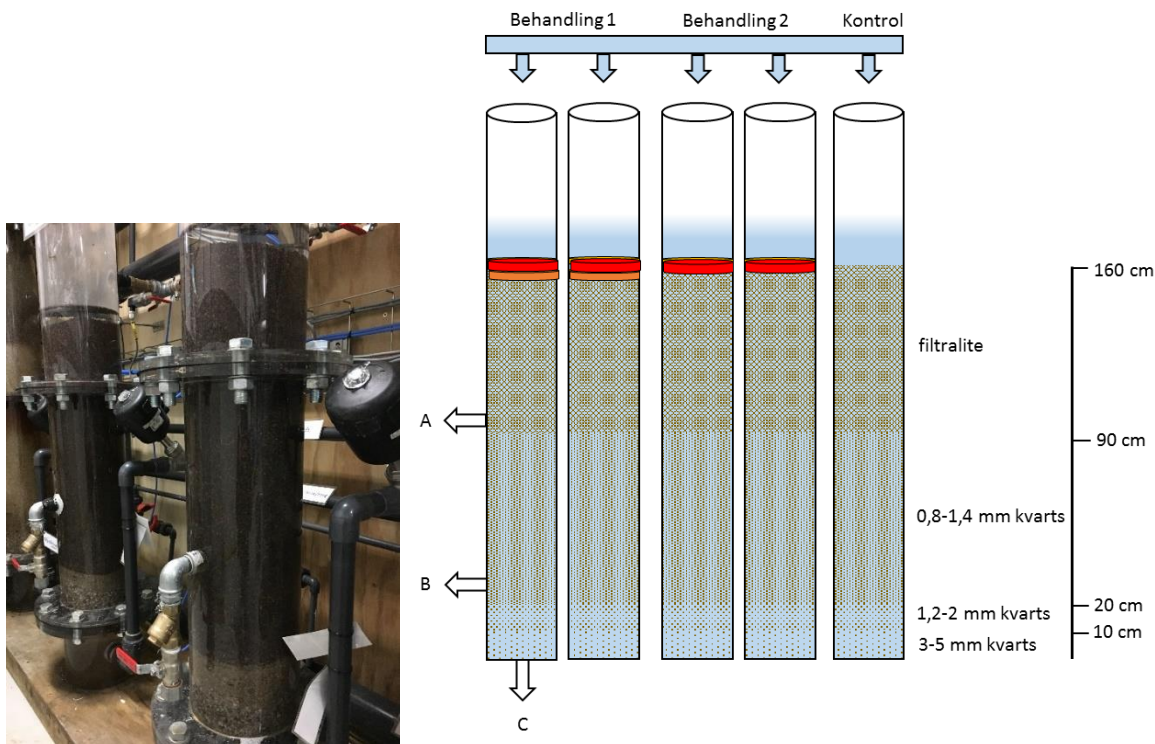
Overordnet ses en fjernelse af 2 mg NH₄/L efter 30 dage, hvorefter fjernelsen går i stå. Forklaringen hertil skyldes en kombination af fjernelsen af ilt i vandet samt et fald i pH. Omkring dag 20 er pH reduceret fra 7 til 6, hvilket kan indvirke på de mikrobielle processer, som foregår optimalt mellem pH 7 og 8 (Zhang et al., 2009). Derudover, bruges til nitrifikationen 4,33 mg O₂ for hvert mg-N fra ammonium, og O₂ kan meget vel blive begrænsende efter at der er fjernet 2 mg NH₄/L (Zhang et al., 2009).

4.3.2 Pilotforsøg på Køge vandværk

Pilotfilteranlægget blev opstillet på det eksisterende Køge vandværk, og kolonnernes tilløb blev forsynet med iltet råvand fra vandværket. En skematisk oversigt over anlægget ses i Figur 8. Effektiviteten af filtrene blev monitoreret ved måling af ammonium, nitrit, og nitrat på indløb, ved to dybder samt udløbsvandet. Derudover, blev der udtaget filtermateriale i kolonnerne under drift i 5 cm og 40 cm dybde på dag 17 og 27, for at kunne kvantificere AOB og NOB baseret på DNA ekstraktioner.

Inden tilsætning af podet Filtralite® og filtersand fra Køge vandværk blev de fem kolonner skyllet for at fjerne fines/støv, og Filtralite® blev vandmættet. Der blev tilsat 2 % af søjlens volumen svarende til ca. 0,8 L podemateriale, hvor podet Filtralite® blev tilsat til både behandling 1 og 2, hvorimod vandværkssandet kun blev tilsat to af søjlerne (behandling 1). Flowhastigheden igennem testkolonnerne var identiske med den, som i vandværkets normale sandfiltre. Hastigheden af vandet per søjle var 100 L/time, hvilket svarer til en opholdstid på 12 minutter, hvis man antager en porøsitet på 0,50. Returskyl af systemet blev foretaget hver fjerde dag med filtreret vand (8 min; 20 L/min).

Koncentrationen af ammonium, nitrit og nitrat er vist i Figur 9, som en funktion af dybden (A, B og C). Da råvandet i Køge indvindes fra forskellige borer er der nogen variation mellem de målte værdier i indløb for henholdsvis ammonium, nitrit og nitrat, der varierer mellem 0,15-0,25 mg NH₄/L, 0,01-0,1 mg NO₂/L og 2,7-3,6 mg NO₃/L.



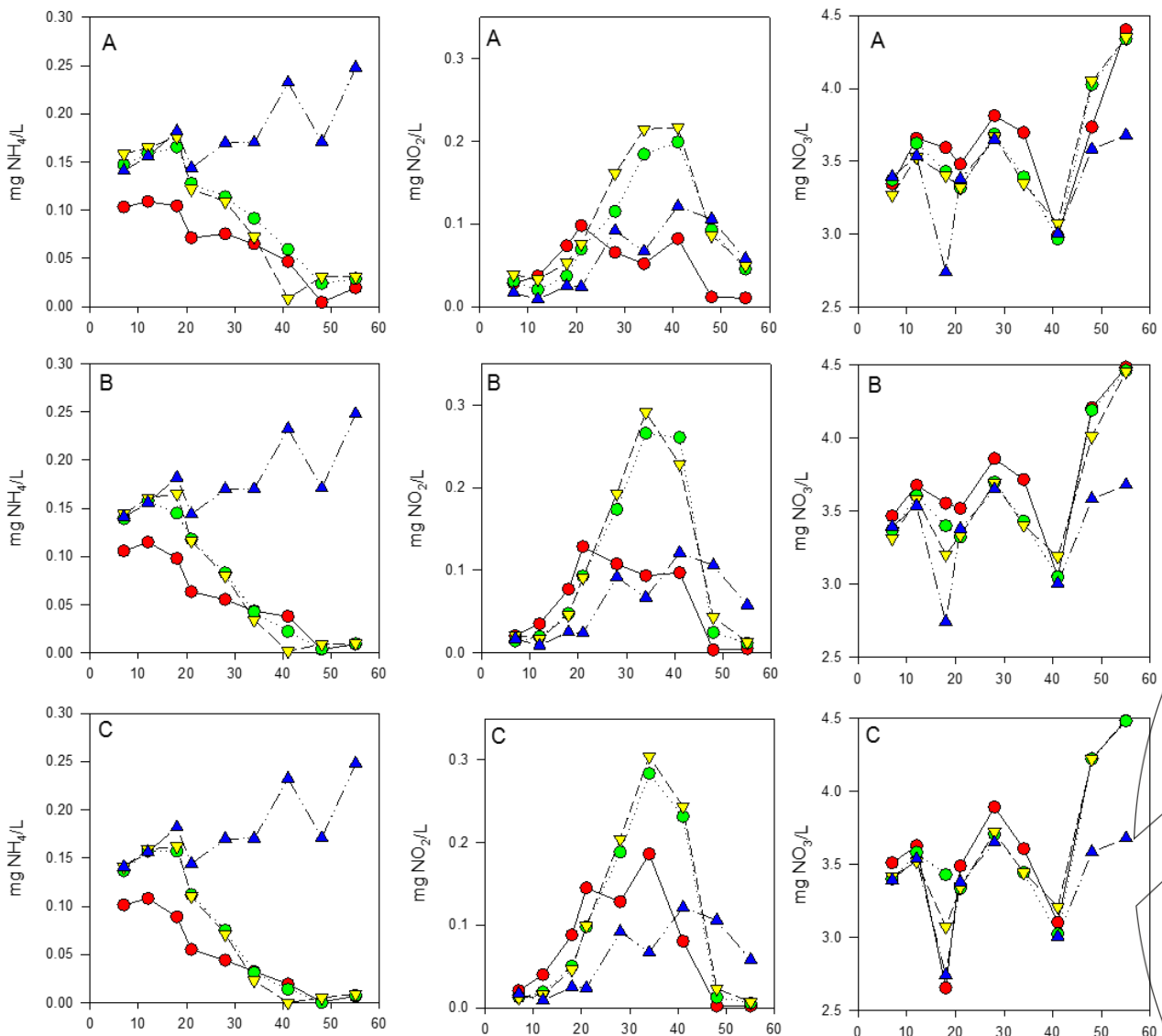
Figur 8. Skematisk opstilling af pilotanlægget opsat på Køge vandværk samt foto. Anlægget består af 5 kolonner (plexiglas cylindre, h200 x Ø18 cm) med nedadgående vandgennemstrømning. Kolonnerne blev fyldt fra neden med 10 cm 3-5 mm kvarts, 10 cm 1,2-2 mm kvarts, 70 cm 0,8-1,4 mm kvarts og 1,5-2,5 mm Filtralite®. Podet Filtralite® er markeret med rødt, og sand fra det eksisterende vandværk er markeret med orange. En kontrolsøjle (uden podemateriale) sammenlignedes med behandling 1 (filtermateriale fra Køge vandværk og podet Filtralite®) og behandling 2 (podet Filtralite®). Under forsøget er der udtaget vandprøver fra råvand (indløb) og fra 3 dybder: A (50 cm dybde), B (110 cm dybde) og C (udløb).

Resultaterne fra pilotforsøget viste, at der overordnet set ikke var forskel på ammonium koncentrationen som funktion af dybden. Dette ses tydeligt ved sammenligning af kurverne fra udtag B og C, som er relativt ens, hvorimod udtag A har lidt højere koncentration af ammonium over tid. Den høje aktivitet i den øverste del af filteret stemmer overens med andre studier (Tatari *et al.*, 2017). Det betyder, at den største omsætning skete i den øvre del af søjlen. Resultaterne viste også, at der ikke var nogen forskel mellem kontrolkolonnen og behandling 2 (podet Filtralite®). Derimod sås en tydelig effekt som følge af tilsætningen af det eksisterende filtermateriale fra Køge vandværk. Allerede efter en uge sås en reduktion af ammonium fra 0,15 til 0,10 mg NH₄/L, hvorimod en tilsvarende reduktion i kontrol og behandling 2 først blev observeret efter ca. 28 dage. Det betyder, at filtermaterialet fra det eksisterende vand vand umiddelbart var i stand til at reducere ammonium koncentrationen med 0,05 mg/L under de eksperimentelle flowhastigheder. Koncentrationer under grænseværdien på 0,05 mg/L blev målt i udløbet (C) efter ca. 20 dage for behandling 1, hvorimod det tog både behandling 2 og kontrolsøjlen 33 dage.

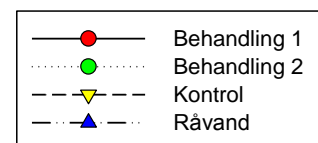
Resultaterne for nitrit viste et lignende billede ved sammenligning af de tre behandlinger. Tilsætning af filtermateriale fra Køge vandværk resulterede i, at der ikke kom samme kortvarige stigning i nitrit koncentrationen, som sås for behandling 2 og kontrol. Det betyder, at på trods af en større omsætning af ammonium til nitrit (AOB), er der allerede bakterier til stede i dette filtermateriale, som kan omdanne nitrit til nitrat (NOB). Det er dog værd at

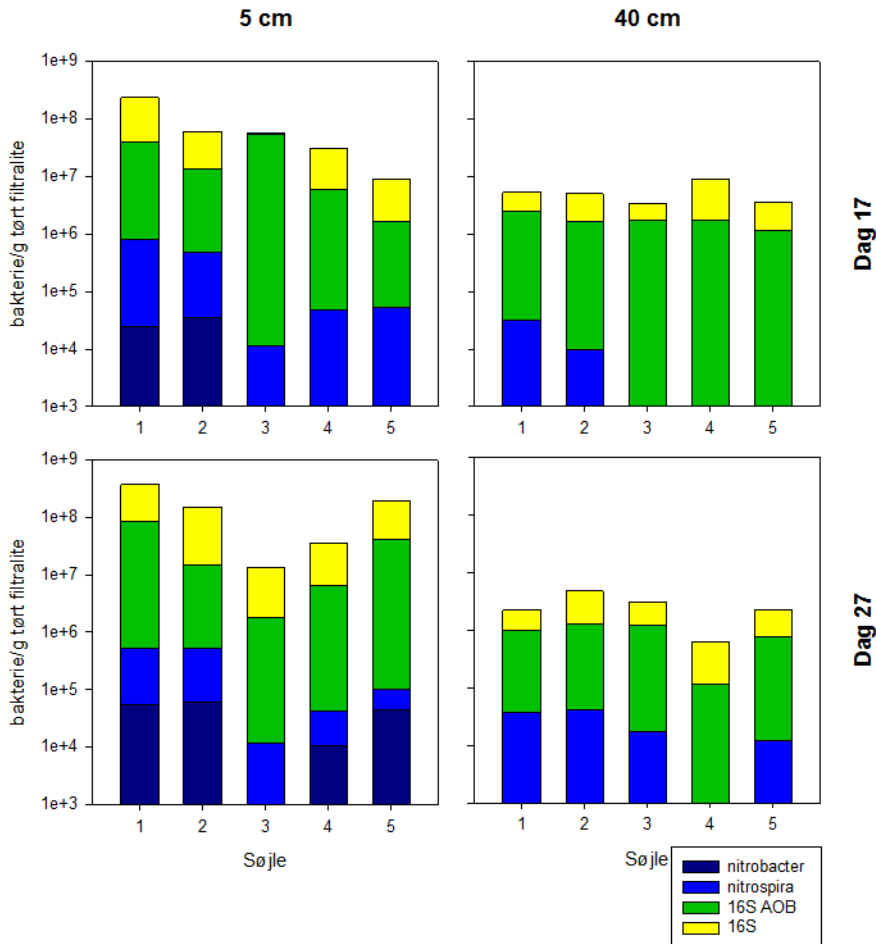
bemærke, at både behandling 1 og 2 resulterer i nitritkoncentrationer under grænseværdien på 0,01 mg/L omkring dag 50, og at der ikke blev observeret en tilsvarende forskel som for ammonium fjernelsen.

For nitrat sås, at råvandet allerede indeholdte fra 2,7-3,6 mg NO₃/L, hvilket kan forklares ved en blanding af aerobt og anaerobt grundvand, som indvindes til vandværket. Ved forsøgets afslutning var der ca. 1 mg NO₃/L mere i udløbet fra søjlerne sammenholdt med indløbskoncentrationen, hvilket svarer til omsætningen af de 0,15-0,25 mg NH₄/L.



Figur 9. Behandling 1 (vandværkssand og podet Filtralite®), behandling 2 (podet Filtralite®) og kontrol (uden podet materiale) samt råvand. A, B og C svarer til dybden, jf. Figur 8.





Figur 9. Fordelingen af NOB (*Nitrobacter* + *Nitrospira*), AOB (16S AOB) og totale antal bakterier (16S) i pilotkolonnerne udtaget på dag 17 og 27 i 5 cm og 40 cm dybde. Behandling 1 (kolonne 1 og 2), behandling 2 (kolonne 3 og 4) og kontrol (kolonne 5)

Prøveudtag i dybden af prøvefiltrene tillod en bestemmelse af, hvorledes processerne spredtes i kolonnerne som funktion af tid og behandling (Figur 9). Behandling 1 adskilte sig fra de andre to behandlinger ved at indeholde *Nitrobacter* i 5 cm dybde på dag 17, hvorimod de fem kolonner alle indeholdte *Nitrospira*, dog var koncentrationen højest for behandling 1. For AOB var koncentrationen mere sammenlignelig både mellem kolonnerne og med dybden. På dag 27 blev der fundet *Nitrobacter* i 4 ud af de 5 kolonner i 5 cm dybde, og der er sket en spredning af *Nitrospira* med dybden.

Den hurtigere opstart ved behandling 1 kan forklares ved at sammenholde resultaterne i Figur 8 og 9. Fundet af *Nitrobacter* i 5 cm dybde på dag 17 samt en 10 gange højere koncentration af *Nitrospira* var højst sandsynligt årsagen til den større ammonium og nitrit fjernelse ved denne behandling. Dette på trods af, at begge er NOB. Nyere forskning har fundet, at arter inden for *Nitrospira* kan lave den komplette oxidation fra ammonium til nitrat (Daims *et al.*, 2016). Derudover, indikerer den sammenlignelige koncentration af AOB

for alle kolonnerne at denne bakteriegruppe ikke har haft en afgørende betydning for de observerede forskelle mellem behandlingerne.

Forsøg på at booste sandfiltre er kun rapporteret få gange tidligere. Et studie af Štembal *et al.* (2004) fandt at opstartstiden kunne reduceres til to uger i to nye sandfiltre, som behandlede forskelligt grundvand, ved at tilsætte en biomasse, som var isoleret fra den faste suspension i skyllevand fra et filter fra et tredje vandværk. Dog mangler dette studie et kontrolforsøg, for at se hvad opstartstiden havde været uden behandling. I stedet refererer de til en typisk opstartstid på nogle måneder. Tilsvarende, i et andet studie af Lytle *et al.* (2007) blev opstarten af et sandfilter testet i pilotkolonner, hvor en kontrol blev sammenlignet med enten tilsætning af eksisterende sand (7 % af total volumen) eller periodisk tilsætning af partikler fra skyllevand. I det sidste studie blev der ikke fundet nogen effekt af behandlingerne.

For at undersøge det podede Filtralite® og vandværkssandet fra Køge nærmere, blev der ekstraheret DNA til 16S amplikon sekventering, for at få et billede af de bakterielle samfund (Figur 10).

Betaproteobacteria; f__Comamonadaceae_OTU_1	30.8	23.9	Nitrospirae; Nitrospira	58.4	63.9	50
Betaproteobacteria; Nitrosomonas	12.8	15	Gammaproteobacteria; f__Methylococcaceae_OTU_12	8.8	7.9	8.1
Betaproteobacteria; Candidatus Nitrotoga	7.2	13.8	Acidobacteria; Blastocatella	4.8	4	4.5
Betaproteobacteria; Polaromonas	9.3	9.8	Alphaproteobacteria; Woodsholea	2.7	2.3	2.9
Gammaproteobacteria; Pseudomonas	9.7	5.1	Gammaproteobacteria; Methyloglobulus	2.4	2	2.8
Betaproteobacteria; f__Comamonadaceae_OTU_16	6.5	7.1	Alphaproteobacteria; Hyphomicrobium	2.1	1.6	2
Alphaproteobacteria; Brevundimonas	4.6	2.7	Alphaproteobacteria; MNG7	1.4	1.1	1.4
Betaproteobacteria; f__Oxalobacteraceae_OTU_17	5.6	1.7	Alphaproteobacteria; f__A0839_OTU_35	1.3	1	1.5
Betaproteobacteria; Nitrospira	2	2	Betaproteobacteria; Leptothrix	0.9	0.8	0.9
Alphaproteobacteria; f__Rhodobacteraceae_OTU_23	2.1	1.3	Bacteroidetes; f__Cytophagaceae_OTU_37	0.7	1	0.8
Betaproteobacteria; Hydrogenophaga	1.4	1.7	Alphaproteobacteria; f__A0839_OTU_81	0.8	0.6	0.8
Alphaproteobacteria; f__Phyllobacteriaceae_OTU_31	1.4	0.8	Alphaproteobacteria; f__Hyphomicrobiaceae_OTU_39	0.8	0.6	0.7
Alphaproteobacteria; Reyranella	1	0.3	Alphaproteobacteria; Pedomicrobium	0.6	0.5	0.8
Alphaproteobacteria; f__Caulobacteraceae_OTU_45	0.6	0.6	Gammaproteobacteria; Crenothrix	0.6	0.5	0.7
Betaproteobacteria; c__Betaproteobacteria_OTU_485	0.1	0.9	Deltaproteobacteria; Haliangium	0.6	0.6	0.6
Alphaproteobacteria; f__Hyphomicrobiaceae_OTU_51	0.6	0.3	Betaproteobacteria; Nitrosomonas	0.6	0.4	0.6
Alphaproteobacteria; f__Bradyrhizobiaceae_OTU_59	0.6	0.3	Betaproteobacteria; f__Comamonadaceae_OTU_64	0.5	0.5	0.5
Alphaproteobacteria; Hyphomicrobium	0.3	0.4	Bacteroidetes; f__Cytophagaceae_OTU_47	0.5	0.4	0.5
Alphaproteobacteria; Sphingopyxis	0.4	0.2	Bacteroidetes; f__Cytophagaceae_OTU_66	0.4	0.5	0.5
Betaproteobacteria; Rhizobacter	0.3	0.2	Alphaproteobacteria; Parvularcula	0.4	0.4	0.5
	F2	F3		SA	SB	SC

Figur 10. Oversigt over de 20 mest udbredte bakterier fra triplikat DNA ekstraktion fra Køge filtersand (SA, SB, SC) og duplikat DNA ekstraktion fra podet filtermateriale (F2, F3). Fra podet Filtralite® er der kun to prøver, fordi koncentrationen var for lav i den tredje DNA ekstraktion. Tallene angiver den procentuelle fordeling.

Sekventeringen viste, at størstedelen (58-64 %) af bakterierne fra (det eksisterende) Køge filtersand består af *Nitrospira*, hvilket stemmer overens med tidligere analyser af vandrensningsfiltre (Gülay *et al.*, 2016; Tatari *et al.*, 2017). Derimod var sammensætningen af det bakterielle samfund anderledes efter opdyrkning og selektering med 1/10 AMM medie,

som blandt andet ikke længere indeholdte *Nitrospira*. Relevante nitrificerende bakterier bestod af: *Nitrosomonas* (13,9 %), *Candidatus Nitrotoga* (10,5 %), *Nitrosospira* (2 %). Af disse grupper tilhører *Nitrosomonas* og *Nitrosospira* AOB, hvorimod *Candidatus Nitrotoga* tilhører NOB. Kendetegnende for disse tre bakteriegrupper er, at de er hurtigt voksende, hvilket der blev selekteret for, ved at have en 1/10 AMM opløsning på 18 mg NH₄/L.

Det vil sige, at på trods af, at det nitrificerende samfund fra det tidligere projekt stod ved 10 grader i ca. et år var det fortsat muligt at aktivere de relevante bakterier. Det største problem ved denne form for opdyrkning skal findes i at opnå en tilstrækkelig høj koncentration på podematerialet. Kvantificering af podet Filtralite[®] viste en koncentration af bakterier på $3,4 \times 10^7$ bakterie /g tørt Filtralite[®], hvorimod filtermaterialet fra Køge havde en koncentration på $5,18 \times 10^9$ bakterie/g tørt sand. Det vil sige, at koncentrationen af bakterier på det eksisterende filtersand var ca. 100 gange højere. På trods af en større andel af relevante nitrificerende bakterier i det opdyrkede materiale, så medførte den lavere koncentration af bakterier, at der totalt set blev tilført færre nitrificerende bakterier til kolonnerne. Denne forskel mellem de to materialer forklarer højst sandsynligt forskellen mellem behandling 1 og 2.

Resultaterne fra pilotforsøget viste, at råvandet fra Køge resulterede i en relativ hurtig opstart af kolonnerne, og at inden for 50 dage var både ammonium og nitrit under grænseværdien for alle tre behandlinger. Denne hurtige opstart har muligvis skjult effekten fra det opdyrkede podemateriale, som viste sig ikke at have nogen effekt sammenlignet med kontrolkolonnen. Til gengæld var der en positiv effekt ved at bruge sand fra det eksisterende filtermateriale på Køge vandværk grundet det højere antal bakterier samt sammensætning af bakterierne.

I modsætning til det tidligere BIO2BOOST projekt viste dette forsøg ingen effekt af det opdyrkede podede Filtralite[®]. Der kan være flere årsager til, at der ikke sås en effekt:

- I dette forsøg blev tilsat 2 % podet filtermateriale af det samlede volumen i modsætning til 4,5 % i det tidligere forsøg
- I Bio2Boost1 havde det opdyrkede sand en koncentration på 2×10^5 bakterie / g sand i forhold til $3,4 \times 10^7$ bakterie /g tørt Filtralite[®] i dette studie.
- Forskelle i råvandet kan medføre en hurtigere kolonisering, hvilket resulterer i en kamouflering af behandlingens effekt i dette studie.
- Forskelle i råvandets ammonium koncentration kan også resultere i manglende effekt. I Bio2Boost1 var den gennemsnitlige koncentration 0,35 mg/L, hvorimod fra dette forsøg var koncentrationen mellem 0,15 og 0,25.
- Kombinationen af råvandets sammensætning, det bakterielle samfund samt koncentrationen heraf vil alle tilsammen påvirke effekten af behandlingen og opstartstiden.

4.3.3 Fuld-skala forsøg på Køge Nyt Vandværk

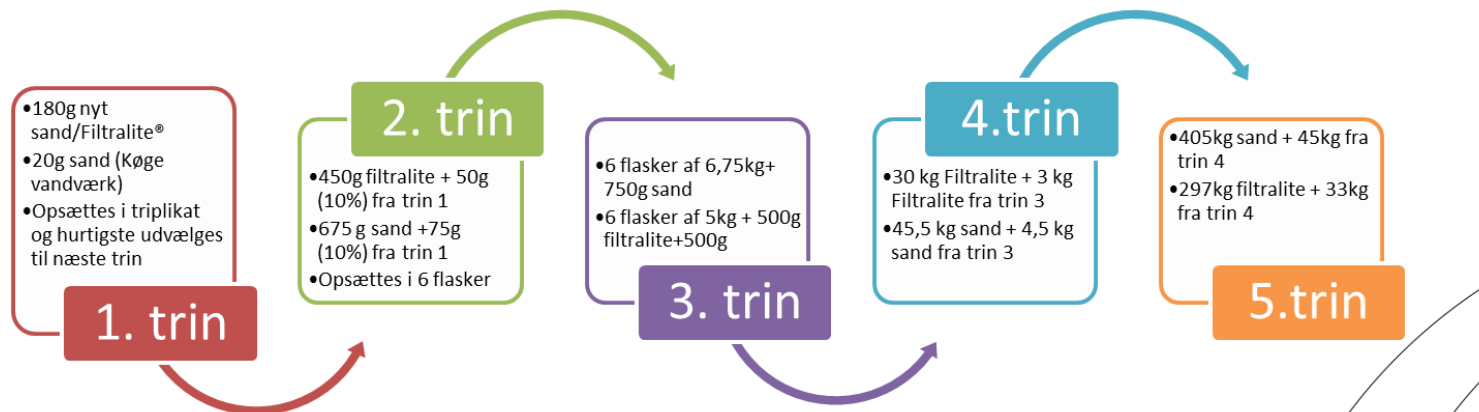
I Maj 2018 blev indkøringen af det nye vandværk i Køge startet. Vandværket er designet med to linjer, hver med iltning (Oxydator™) og to parallelle dual-medie filtre.

På samme vis som i pilotforsøget blev det valgt at tilsætte 2 % podet filtermateriale beregnet ud fra det samlede volumen. Da pilotforsøget havde vist manglende effekt med podet Filtralite[®], blev det valgt at teste både en opdyrkning på sand og på Filtralite[®]. En mulig risiko ved brugen af podet Filtralite[®] er, at der i forbindelse med returskyl, kan udvaskes

Filtralite® grundet en lav densitet, men risikoen er reelt meget lav, når materialet er vandmættet.

Derudover, blev det valgt at tage udgangspunkt i frisk filtermateriale fra det eksisterende Køge vandværk, og lave en ny opformering af podemateriale. Teorien og opdyrkningen forblev den samme som fra BIO2BOOST projektet. I modsætning til opdyrkningen i de tidligere forsøg i dette projekt, blev der under den sidste større opformering til Køge Ny Vandværk yderligere tilsat 0,3 mM NO₂, for at højne andelen af NOB.

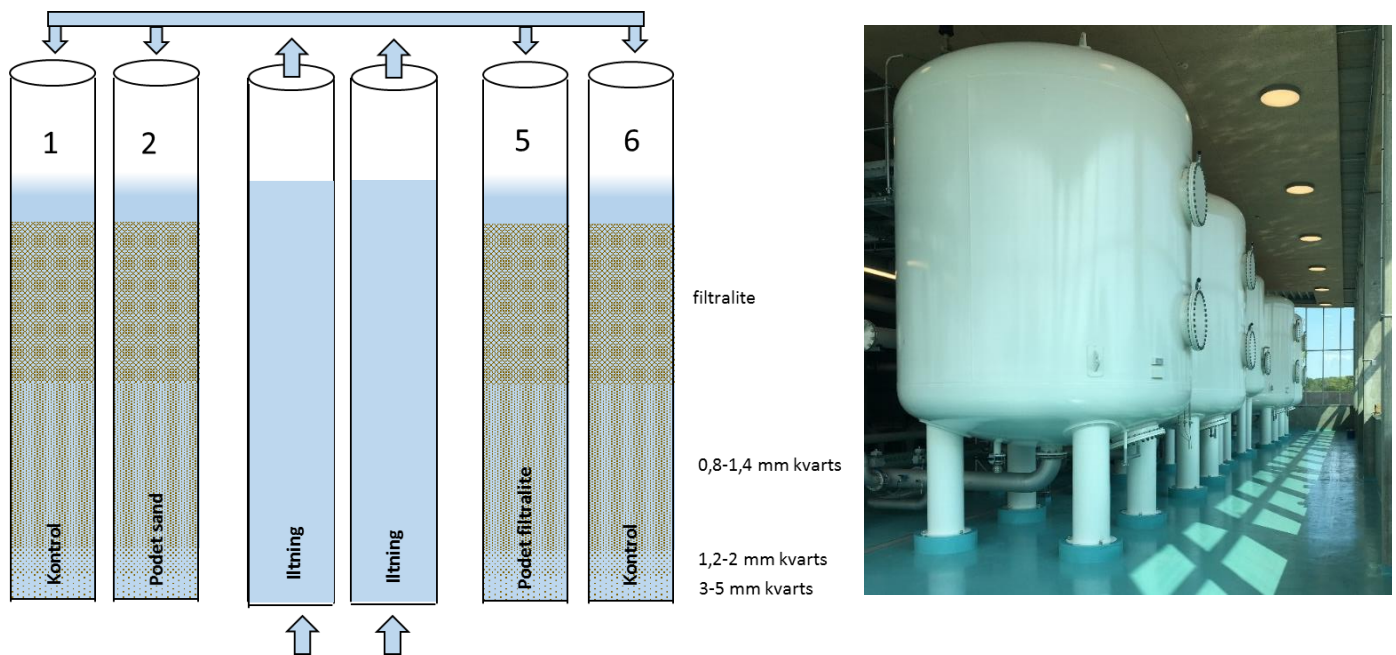
Opformering af podet sand og podet Filtralite®, som ultimativt svarede til 2 % af det samlede filtervolumen medførte nogle praktiske udfordringer. I Figur 11 ses en oversigt over opdyrkning fra 200 g til henholdsvis 450 kg sand og 330 kg Filtralite®. Processen startede med 500 mL sterile blue-cap flasker og sluttede med 200L tønder (Figur 12). Opdyrkningen i de blå tønder skete med cirkulation, for at sikre, at vandet blev iltet, og derved optimere opformeringen af nitrificerende bakterier.



Figur 11. Procesoversigt over opdyrkningen af 2% podemateriale til Køge nyt vandværk.



Figur 12. Billeder fra opdyrkningen af podet filtermateriale. Materialet blev flyttet i 20L sorte spande fra de fem 200 L blå tønder til sandfiltrene.



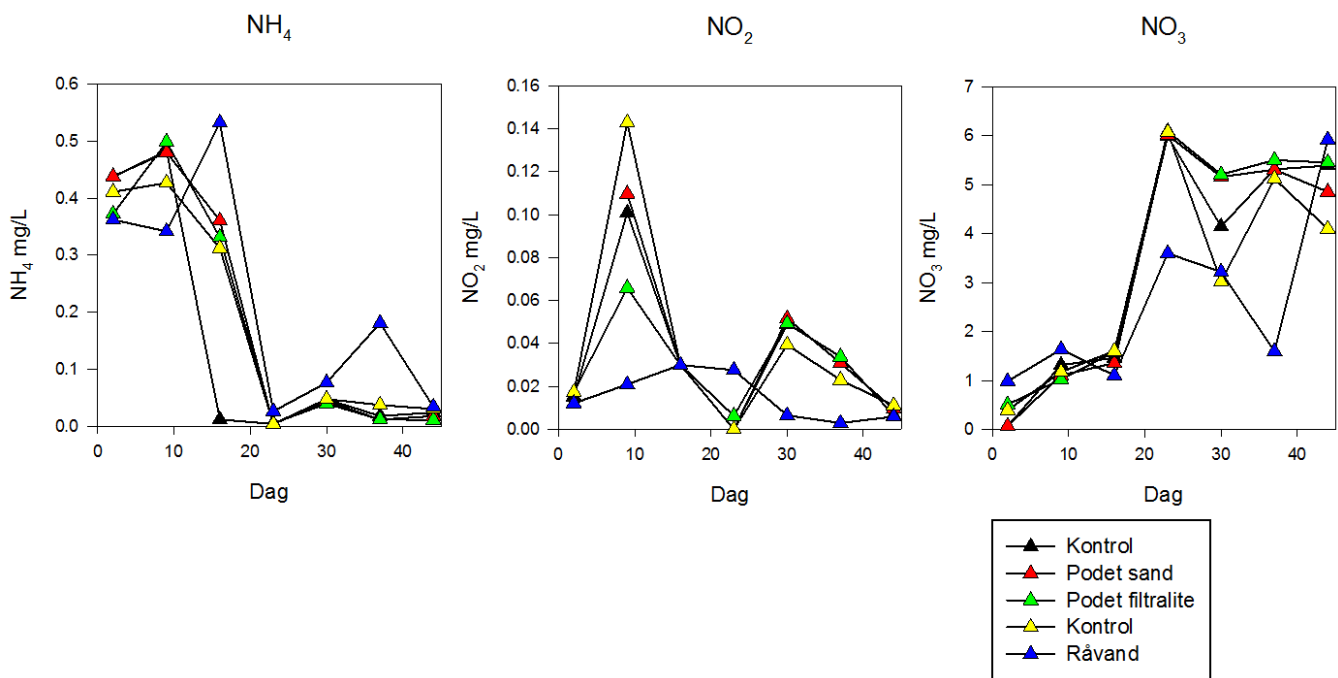
Figur 13. Billede fra Køge nyt vandværk samt skitse over forsøgsplan. De fire filtre er ens bortset fra filter 2 og 5, hvori der er tilsat henholdsvis 2 % podet sand og 2 % podet Filtralite®.

Som skitseret i Figur 13, består vandværket af fire sandfiltre og to iltningstanke fordelt på to linjer. For hver linje blev der udvalgt et kontrolfilter og et filter tilsat podet filtermateriale, henholdsvis podet sand og podet Filtralite®.

De første 20 dage kørte anlægget med nedsat flow. Dette skyldtes primært, at vandet blev sendt til det gamle vandværk i Køge, hvor det blev rensat igen, inden det blev udledt til forbrugerne. Derudover, var der for højt kimtal i vandet, hvilket er almindeligt under opstart af nye filtre. Det gennemsnitlige flow for hvert af de fire filtre var $5 \text{ m}^3/\text{time}$. Efter de ca. 20 dage blev flowet sat op til $40 \text{ m}^3/\text{time}$ for hvert filter.

Tilsvarende pilotforsøget skete der en hurtig opstart af de fire filtre. Koncentrationen af ammonium i råvandet svingede mellem ca. 0,01 og 0,5 mg/L. Den relativt lave koncentration i kombination med den lave hydrauliske belastning gjorde, at ammoniumkoncentrationen i de fire filtre lå under grænseværdien inden for de første tre uger. Der skete dog en svag stigning i ammoniumkoncentrationen i forbindelse med at flowet blev sat op efter dag 20, dog forblev koncentrationen under grænseværdien herfra. Under opstarten blev der igen ikke observeret en effekt af de forskellige behandlinger. Mulige årsager hertil kan være den lave koncentration af ammonium i råvandet, samt en hurtig kolonisering af de nye filtre med mikroorganismer fra råvandet.

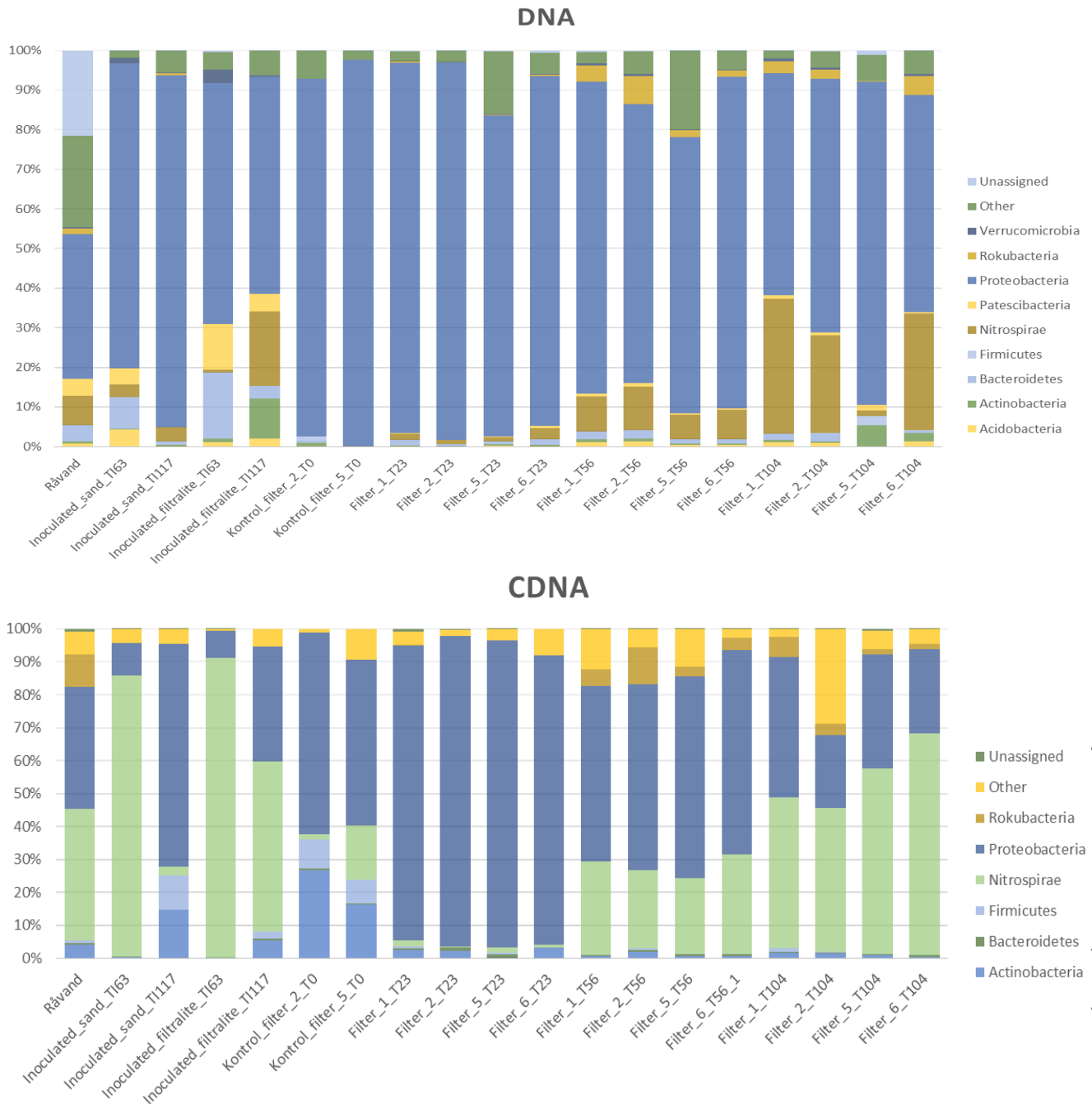
For nitrit sås en stigning i koncentration omkring dag 10, hvilket sandsynligvis skyldtes, at omsætningen af ammonium gik hurtigt i gang, men at NOB bakterier ikke havde koloniseret filteret i tilstrækkeligt omfang. Nitrit koncentrationen faldt til under grænseværdien ved dag 20, men i forbindelse med at flowet øges kom et mindre peak igen. Dette peak aftog hurtigt, og omkring dag 44 var både ammonium og nitrit under grænseværdierne. For nitrat var koncentrationen i råvandet og de fire filtre ens de første 18 dage, hvor det varierede fra 0-2 mg/L. I forbindelse med at hastigheden øges, sås en stigning i nitrat koncentrationen. Stigningen til omkring 6 mg/L skyldes, at der blev indvundet iltet råvand fra andre borer (og dermed en anden type råvand).



Figur 14. Koncentrationer af ammonium, nitrit og nitrat over tid ved opstarten af Køge ny vandværk for to kontrol filtre og et med podet Filtralite® og et med podet sand. De første to værdier for ammonium i råvandet burde være højere end udløbskoncentrationen, og skyldes højst sandsynligt fejl omkring prøvetagning eller analysen.

Der blev løbende udtaget prøver til DNA og RNA både under opformeringen af de to podematerialer sand og Filtralite®, samt under opstarten af de fire nye filtre. Disse prøver blev 16S amplikon sekventeret, og Figur 15 viser en procentuel fordeling af bakterier, som var enten i råvandet, podet sand/Filtralite® eller i de nye filtre over tid.

Der blev ekstraheret både DNA og RNA, fordi DNA viser, hvilke bakterier, der er til stede (både levende og døde), mens RNA indikerer, hvilke bakterier, der er aktive. Der er dog studier, som viser, at RNA ikke er så anvendelig som mange ellers antager, da RNA molekylet er ganske holdbart, og derfor også kan findes i mindre aktive celler, eller i højere antal i meget aktive celler (Blazewicz *et al.*, 2013).



Figur 15. Oversigt over fordelingen af bakterier fra DNA og RNA (cDNA) i: råvandet, inokuleret sand og Filtralite til henholdsvis dag 63 og 117, to kontrol prøver fra filter 2 og 5 (inden opstart), udtag fra dag 23, 56 og 104 for henholdsvis filter 1, 2, 5 og 6. Farverne er forskellige i de to figurer, og henviser ikke til de samme grupper af bakterier.

Fordelingen af bakterier fortæller noget om de egenskaber, som det bakterielle samfund har. Da dette projekt handler om nitrifikation, fokuseres der på det *phylum*, som hedder *Nitrospirae*. Denne gruppe af bakterier er relativt lille, og består kun af en familie *Nitrospiraceae*. Denne familie er domineret af *Nitrospira*, hvilken netop er meget relevant for processerne i filterne.

Under opdyrkningen blev der ekstraheret DNA og RNA på dag 63 og 117, svarende til henholdsvis afslutning på trin 3 og trin 5 (Figur 11). For DNA sås en stigning af *Nitrospira* fra dag 63 til dag 117. Derimod sås det modsatte for RNA, hvor *Nitrospira* udgjorde 80-90% på dag 63, men på dag 117 er denne andel faldet til 5% for sand og 50% for Filtralite®. Disse data indikerer, at enten skal opformeringen ske inden for ca. to måneder, eller også skyldes dette fald, at det ikke var muligt at forhindre, at andre bakterier kontaminerede det nitrificerende samfund.

Råvandet, som sikkert er den vigtigste parameter for en succesfuld opstart indeholdte ca. 10% *Nitrospira* på DNA niveau, hvorimod på RNA niveau var det ca. 40% af det samlede antal bakterier.

Fra de fire filtre sås, at indholdet af *Nitrospira* på DNA niveau steg fra ca. 5%, 10% til 30% på dag 23, 56 og 104. Tilsvarende for RNA sås en stigning fra <5%, 25% til 50%. Udviklingen i de fire filtre var sammenlignelige, og der kan i dette datasæt ikke ses nogen effekt af podningen i filter 2 og 5.

4.4 Konklusion

Fra laboratorieforsøgene sås, at der generelt kun var små forskelle mellem de tre filtermaterialer sand, anthrazit og Filtralite®. Under opdyrkningen blev observeret en hurtigere fjernelse af ammonium ved behandlingen med Filtralite®. Denne effekt kunne dog ikke genvises i små kolonneforsøg, hvor der ikke blev observeret forskelle mellem de tre materialer.

Pilotskala forsøget viste, at der kan opdyrkes et konsortium af nitrificerende bakterier, men at koncentrationen af disse på nuværende tidspunkt ikke er høj nok til effektivt at booste opstarten af et nyt filter. Det eksisterende filtersand fra Køge vandværk var bedre til at booste opstarten, hvilket højst sandsynligt skyldes ca. 100 gange flere bakterier på dette materiale. Ud over antallet af bakterier vil sammensætningen af disse også have en betydning.

Tilsætning af starterkulturer til nye sandfiltre på Køge Nyt Vandværk var ikke i stand til at reducere opstartstiden for effektiv ammoniumfjernelse, sammenlignet med kontrolfiltre uden tilsætning. Dog startede ammoniumfjernelsen generelt set meget hurtigt både i filtre med og uden starterkulturer, hvilket kan have maskeret en eventuel positiv effekt.

Det vil derfor være formålstjenesteligt at teste teknologien på 'problemvandværker' hvor opstartstiden er lang. På nuværende tidspunkt er der ikke nogle kendte parametre, som indikere langsom opstart. Det må dog forventes, at sammensætningen af råvandet og dets indhold af bakterier og næringsstoffer, må have stor betydning.

5 Litteraturliste

Albers CN, Ellegaard-Jensen L, Hansen LH, Sørensen SR. (2018). Bioaugmentation of rapid sand filters by microbiome priming with a nitrifying consortium will optimize production of drinking water from groundwater. *Water Res* **129**: 1–10.

Blazewicz SJ, Barnard RL, Daly RA, Firestone MK. (2013). Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J* **7**: 2061–2068.

Daims H, Lücker S, Wagner M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol* **24**: 699–712.

Graham DW, Knapp CW, Van Vleck ES, Bloor K, Lane TB, Graham CE. (2007). Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME J* **1**: 385–393.

Gülay A, Musovic S, Albrechtsen H-J, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Smets BF. (2016). Ecological patterns, diversity and core taxa of microbial communities in groundwater-fed rapid gravity filters. *ISME J* **10**: 2209–2222.

Hermansson A, Lindgren PE. (2001). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 972–6.

Krymmel A, Harms H. (1982). Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* **133**: 50–54.

Lytle DA, Sorg TJ, Wang L, Muhlen C, Rahrig M, French K. (2007). Biological nitrification in a full-scale and pilot-scale iron removal drinking water treatment plant. *J Water Supply Res Technol* **56**: 125–136.

Sørensen SR. (2017). Udvikling af starterkulturprodukter til etablering af biologiske omsætnings-processer i vandrensningfiltere. Copenhagen.

Spieck E, Hartwig C, McCormack I, Maixner F, Wagner M, Lipski A, *et al.* (2006). Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured Nitrospira-like bacterium from activated sludge. *Environ Microbiol* **8**: 405–415.

Štembal T, Markić M, Briški F, Sipos L. (2004). Rapid start-up of biofilters for removal of ammonium, iron and manganese from ground water. *J Water Supply Res Technol* **53**: 509–518.

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605–14.

Tatari K, Musovic S, Gülay A, Dechesne A, Albrechtsen H-J, Smets BF. (2017). Density and distribution of nitrifying guilds in rapid sand filters for drinking water production:

Dominance of *Nitrospira* spp. *Water Res* **127**: 239–248.

Zhang Y, Love N, Edwards M. (2009). Nitrification in Drinking Water Systems. *Crit Rev Environ Sci Technol* **39**: 153–208.

