

Teknisk rapport

Undersøgelse af mikrobiologisk nedbrydning af Desphenyl-chloridazon (DPC), og N,N-dimethylsulfamid (DMS) på vandværker – Baseret på metanoxidation



Af Anne H. Thomsen¹, Emilie K. Bovin¹, Estelle M. Goonesekera¹, Charlotte S. Vesterlund²,
Rasmus Boe-Hansen³, og Hans-Jørgen Albrechtsen¹

¹ DTU Environment, Danmarks Tekniske Universitet, ² TREFOR Vand A/S, ³ Krüger Veolia Water Technologies

Forskning udført med finansiell støtte fra Vandsektorens Udviklings- og Demonstrationsprogram (VUDP-Projekt: Chloridazon, ID 4328.2018), Dansk Vand- og Spildevandsforening, DANVA.

Forord

Denne rapport udgør afrapportering af VUDP-projektet: "Mikrobiologisk nedbrydning af Desphenyl-chloridazon på vandværker – Baseret på metan oxidation" (ID 4328.2018). Projektet er udført i perioden december 2018 til maj 2021 med støtte fra VUDP (Vandsektorens Udviklings- og Demonstrationsprogram). Projektet er et samarbejde mellem Krüger A/S, TREFOR Vand og DTU Miljø.

Projektgruppen har bestået af:

- Anne H. Thomsen og Hans-Jørgen Albrechtsen, DTU Miljø
- Rasmus Boe-Hansen, Krüger Veolia Water Technologies
- Charlotte S. Vesterlund og Ida B. Jakobsen, TREFOR Vand A/S

Tak til øvrige bidragsydere i projektet: Mathilde H. Jørgensen, HOFOR. Manuela Schliemann-Haug, Mathias N. Pedersen, Naja R. I. Nielsen, Thea F. Hummelshøj, Hanne Bøggild, Lene K. Jensen og Mikael Olsson, DTU Miljø.

Desuden en speciel tak til alle de medvirkende vandværker: Borre Vandværk, Anonymt Vandværk, Sjælsø Vandværk, Ullerup Vandværk, Nykøbing Falster Vandværk, Skælskør Nordre Vandværk, Skovmølleværket, Svendborg Vandværk, Kerteminde Vandværk, Tolne Vandværk og Bredkær Vandværk.

Sammenfatning

Pesticidnedbrydningsprodukter som Desphenyl-chloridazon (DPC) og N,N-dimethylsulfamid (DMS) udfordrer den danske vandforsyning. Stofferne findes i boreriger landet over og ofte i koncentrationer omkring eller over grænseværdien på 0,1 µg/L. Da den nuværende vandbehandling ikke er designet til at fjerne disse pesticidnedbrydningsprodukter, er der opstået et akut behov for at afdække mulige renseteknologier. Dette projekt udsprang af tidligere studier på DTU Miljø, som viste, at mikroorganismer til stede i sandfiltre på danske vandværker kan nedbryde nogle pesticider, og at der er sammenhæng mellem metanoxidation og fjernelse af pesticidet bentazon (Hedegaard, 2018). Da en mikrobiologisk fjernelse ved hjælp af eksisterende infrastruktur er ressource- og energi-effektiv sammenlignet med videregående vandbehandling som fx aktivt kul, er det relevant at undersøge om disse tidligere erfaringer kan overføres til andre stoffer.

Formålet med projektet har derfor været at undersøge mulighederne for en ny renseteknologi til at fjerne pesticidnedbrydningsprodukter (DPC og DMS) baseret på co-metabolisk nedbrydning ved hjælp af metanoxiderende bakterier.

Projektet har været struktureret i en række arbejdsopgaver, der har undersøgt følgende:

1. Screening af nedbrydningspotentialer
2. Optimering af nedbrydningspotentialer
3. Skalérbarhed og design af konceptuel renseteknologi

1. Screening af nedbrydningspotentialer

Der er udført en række batchforsøg med biologisk materiale fra 10 forskellige danske vandværker. Med biologisk materiale menes sand fra vandværkssandfiltre eller udskrabt bakterie-biomasse fra beluftningstanke. Batchforsøgene er udført efter samme forsøgsprincipper: Biologisk materiale er tilsat vand med relevante lave koncentrationer af pesticidnedbrydningsprodukterne (~2 µg/L). Nedbrydningen er målt som en koncentrationsændring over tid i kontakt med det biologiske materiale. Abiotske kontroller er opstillet sideløbende for at afklare, om fjernelsen er biologisk og skyldes det tilsatte materiale indsamlet fra vandværkerne.

Konklusioner

Biologisk aktive batchforsøg:

- Biologisk materiale fra nogle vandværker har potentiale til at fjerne DPC og DMS. Der er generelt et fald i koncentrationen over tid som resultatet af kontakt mellem pesticidholdigt drikkevand og filtersand.
- Biologisk materiale fra vandværker som behandler råvand med betydelig forurening af pesticidnedbrydningsprodukterne DPC eller DMS har generelt ikke vist potentiale for fjernelse af stofferne. Adaptionforsøg, hvor det biologiske materiale har været i kontakt med pesticidforurenede vand over en længere periode (~2 måneder), har heller ikke vist et øget potentiale for at fjerne stofferne. Disse resultater indikerer, at den observerede fjernelse ikke skyldes en direkte, metabolisk biologisk nedbrydning.
- Biologisk materiale fra vandværker, med højt indhold af metan i råvandet har generelt et større potentiale for at fjerne pesticidnedbrydningsprodukterne. Dette tyder på, at en evt. biologisk nedbrydning kan være co-metabolisk og baseret på metanoxidation.
- Det største potentiale for fjernelse er observeret i biologisk materiale fra Sjælsø Vandværk (anlæg II). Her blev der fundet en fjernelse af DPC på 23 % og en fjernelse af DMS på 35 % efter 14 dages kontakt med filtersand.

Abiotiske kontroller:

- Kontrolforsøg uden filtersand har i screeningen af nedbrydningspotentiale hverken brugt ilt eller metan. Dette indikerer, at der ikke er betydelig biologisk aktivitet i drikkevand, som kan nedbryde pesticidmetabolitterne.
- Koncentrationen af pesticidnedbrydningsprodukterne forbliver stabil over tid i kontrolforsøg uden filtersand, så fjernelsen i forsøgene med biologisk materiale fra vandværker skyldes det tilsatte materiale.
- Metanoxiderende bakterier til stede i filtersand hæmmes ved autoklavering eller kemikalietilsætning (azid eller zink), da abiotiske kontroller ikke forbruger metan.
- De abiotiske kontroller forbruger ilt, hvilket enten kan skyldes, at der fortsat er heterotrofe mikroorganismer til stede efter autoklavering eller kemikalietilsætning, eller at filtersandet i sig selv har et kemisk iltforbrug.
- I nogle abiotiske kontroller er der et indledende fald i koncentration af pesticidnedbrydningsprodukter, hvilket indikerer, at stofferne adsorberer til det tilsatte filtermateriale. Adsorptionen er generelt større for DPC end for DMS.
- Da der er observeret et fald i koncentrationerne over tid i abiotiske kontroller, kan det ikke entydigt påvises, at fjernelsen i de biologisk aktive skyldes biologisk nedbrydning. Der er ikke observeret et metanforbrug i abiotiske kontroller, og derfor vil fjernelsen ikke skyldes en co-metabolisk nedbrydning baseret på metanoxidation, men i stedet en biologisk nedbrydning af andre bakterier og/eller en kemisk proces.

2. Optimering af nedbrydningspotentialet

For at optimere nedbrydningspotentialet med henblik på at kunne overføre det til Staurbyskov Vandværk er der udført batchforsøg med biologisk materiale fra et vandværk med nedbrydningspotentiale. Optimeringen har taget udgangspunkt i resultaterne fra screeningen, hvor filtersand fra Sjælsø anlæg II viste det største potentiale. Derudover har projektet med afsæt i den observerede sammenhæng med metanoxidation, undersøgt optimeringsmulighederne ved at anvende en kultur af metanoxiderende bakterier (MOB). Batchforsøgene har systematisk undersøgt, hvorvidt en række parametre: Substrat-forhold, kobbertilsætning og doseringsstrategi kan optimere nedbrydningspotentialet.

Konklusioner

Tilsætning af metan:

- Ved tilsætning af metan til batchforsøg øges forbruget af både metan og ilt, hvilket indikerer, at aktiviteten af MOB til stede i sandfiltrene stimuleres.
- Øget tilsætning af metan (2 til 10 mg CH₄/L) til batchforsøg i materiale fra sandfiltre øger ikke fjernelsen af DPC eller DMS.
- Forsøg med en MOB kultur viste ikke potentiale for at fjerne DPC eller DMS, og der er ikke observeret effekt ved tilsætning af metan.

Substrat-forhold:

- Der er ikke fundet nogen effekt af at ændre forholdet mellem primært substrat (metan) og sekundært substrat (pesticidnedbrydningsprodukt), da et ændret substrat-forhold (3:1 til 3000:1) ikke påvirker fjernelsen af DPC eller DMS hverken i sandfiltre eller i MOB kultur.

Kobberkoncentration:

- Kobberkoncentration (1 til 1000 µg Cu²⁺/L tilsat) havde ingen effekt på fjernelsen af DPC eller DMS i filtersand. Der var heller ingen effekt af at fjerne kobber ved tilsætning af en chelator.

Doseringsstrategi:

- Der er ikke observeret nogen effekt af ændret doseringsstrategi på fjernelsen af DPC eller DMS i filtersand, dvs. der er fx ikke nogen virkning af at udsulte filtersandet for metan før tilsætning af pesticidnedbrydningsprodukt, og forsøg med MOB kulturen har ikke vist at fjernelsen af DPC og DMS er koblet til en bestemt vækstfase.

Positiv kontrol:

- Batchforsøg med bentazon har vist en fuld fjernelse efter 7 dages kontakt med filtersand, og har dermed fungeret som en positiv kontrol af metode- og forsøgsdesign.
- Batchforsøg med bentazon har samtidig vist, at nedbrydningen kan være koblet til metanoxidation, og kan optimeres: 1) fjernelsen i filtersand har overordnet været størst under tilsætning af metan jf. resultaterne fra screeningen, og 2) doseringsstrategien for metan og pesticid har påvirket fjernelsen af bentazon jf. resultaterne fra forsøg med MOB-kulturen.

3. Skalérbarhed og konceptuel design af renseteknologi

Med baggrund i resultaterne fra både screening og optimeringsundersøgelserne er skalérbarheden af processen vurderet i forhold til en evt. fremtidig implementering i drikkevandsbehandling. Her er det bl.a. undersøgt, om det observerede potentiale kan overføres til Staurbyskov Vandværk, og hvorvidt biologisk nedbrydning udgør en mulig strategi til behandling af drikkevand. Dette er vurderet på baggrund af omregning af potentialet i batchforsøg til et forventet potentiale i drikkevandsbehandling.

Konklusioner

Overførsel af potentiale:

- Potentialet for at fjerne DPC og DMS kan i nogle tilfælde overføres fra biologisk materiale i ét filter til et andet. Filtersand fra ét vandværk har fx vist potentiale for at fjerne pesticidnedbrydningsprodukterne DPC og DMS fra vand fra et andet vandværk.
- Bioargumentation med en MOB kultur (3 vol. %) kan stimulere potentialet for at fjerne DPC og DMS i filtersand.
- Bioargumentation med filtersand (50:50) fra et vandværk kan stimulere potentialet for fjernelse af DPC og DMS på et andet vandværk.

Skalérbarhed:

- Der er ikke identificeret nogle optimeringsparametre i blandt de undersøgte hhv. metantilsætning, substratforhold, kobberkoncentration eller doseringsstrategi for fjernelsen af DPC eller DMS på vandværker.
- Potentialet for at fjerne DPC og DMS er relativt lavt sammenlignet med det identificerede potentiale for nedbrydning af bentazon (positiv kontrol).
- Det identificerede potentiale for at fjerne DPC og DMS er ikke umiddelbart relevant i forhold til dansk drikkevandsbehandling med traditionel sandfiltrering med en opholdstid på ca. 20 min.

Projektets overordnede konklusioner

Der er udført en systematisk og geografisk bred screening af potentialet for mikrobiologisk nedbrydning af DPC og DMS på danske vandværker, som overordnet set har indikeret, at filtersand har et potentiale for at fjerne DPC og DMS. Laboratorieforsøg har ikke identificeret nogle optimeringsmuligheder blandt de undersøgte parametre, og resultaterne har ikke kunnet vise en sammenhæng mellem metanoxidation og fjernelse af DPC og DMS. Potentialet for en mikrobiologisk nedbrydning er overordnet vurderet lavt, sammenlignet med fx potentialet for at fjerne bentazon, og hastigheden er på nuværende tidspunkt ikke relevant i forhold til en evt. implementering i dansk drikkevandsbehandling. Projektet har dermed ikke dannet grundlag for udvikling af en ny renseteknologi med mikrobiologisk nedbrydning baseret på metanoxidation. Resultaterne har imidlertid bidraget med vigtig viden til gavn for vandbranchens beredskab i forhold til håndtering af pesticidnedbrydningsprodukter.

Indhold

Forord	2
Sammenfatning	3
Indhold	6
1. Baggrund	7
1.1 Erfaringer fra indledende laboratorieundersøgelser	7
1.2 Projektets formål	9
3. Screening af nedbrydningspotentiale	10
3.1 Udvælgelse af vandværker	10
3.2 Metodebeskrivelse for screening af nedbrydningspotentiale	11
3.3 Resultater fra batchforsøg i screeningen	13
3.4 Opsamling af resultater fra screeningen	20
3.5 Konklusioner fra screeningen	23
4. Optimering af nedbrydningspotentialet	24
4.1 Metodebeskrivelse for optimering af nedbrydningspotentiale	24
4.1 Tilsætning af metan.....	27
4.2 Effekt af substrat-forhold	28
4.3 Kobber koncentration og MMO udtrykt i MOB	29
4.4 MOB kultur og substrat-forhold	29
4.5 Opsamling af resultater fra optimering af nedbrydningspotentialet	31
4.6 Konklusioner fra optimering af nedbrydningspotentialet.....	33
5. Skalérbarhed og konceptuelt design af renseteknologi	34
5.1 Metodebeskrivelse for overførsel af potentiale	34
5.1 Overførsel af potentiale.....	34
5.2 Vurdering af skalérbarhed.....	36
5.3 Konklusioner fra vurdering af overførsel af potentiale og skalérbarhed	37
Konklusioner	38
Referencer	39
Bilag 1: Udvikling af forsøgsdesign og vurdering af metode ift. prøveudtagning, -opbevaring og analyseusikkerhed	41
Bilag 2: Ilt- og metanforbrug i nedbrydningsforsøg.....	45

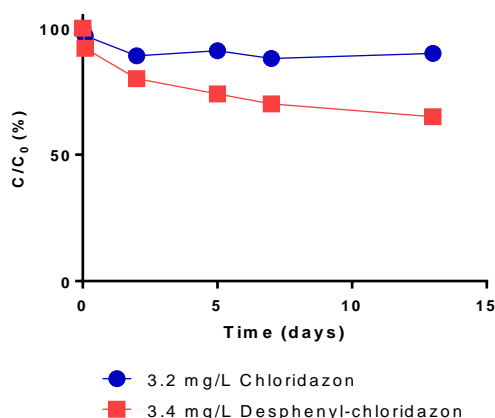
1. Baggrund

I 2017 blev pesticidet Chloridazon (CHL) og dets nedbrydningsprodukter Desphenyl-chloridazon (DPC) og Methyl-desphenyl-chloridazon (MDPC) fundet hos flere fynske vandforsyninger. I en efterfølgende screening blev stoffet DPC fundet i 29 % af alle undersøgte indtag og i koncentrationer over grænseværdien på 0,1 µg/l i 17 % af de undersøgte indtag (GEUS, 2018). De to nedbrydningsprodukter DPC og MDPC blev derfor tilføjet den obligatoriske monitorering, hvor GRUMO'en senere viste, at DPC var fundet i 22 % af de danske vandværksboringer (Thorling et al., 2019). I 2018 blev endnu et pesticidnedbrydningsprodukt: N,N-dimethylsulfamid (DMS) fundet i dansk grundvand (GEUS, 2019), og blev efterfølgende det hyppigst forekommende pesticidstof i den danske boringskontrol. DMS blev konstateret i op mod 30 % af vandværksboringerne og med fund over grænseværdien i 8 % af boringerne (Thorling et al., 2019). De høje fundhyppigheder og koncentrationer af pesticidnedbrydningsprodukter udfordrer en lang række vandværker, hvor flere måtte tage boringer ud af drift eller helt lukke indvinding og produktion på meget berørte værker. Da DPC og især DMS er polære stoffer med en relativt lave K_{ow} -værdier, blev der rejst tvivl om effektiviteten af at rense med aktivt kul, da den lave sorption vil medføre en kort levetid af filtrene. Derfor er det relevant at undersøge alternative rensmuligheder for stofferne.

Undersøgelser på DTU Miljø har tidligere vist potentiale for mikrobiologisk nedbrydning af flere forskellige pesticider i filtersand fra danske vandværker (Hedegaard & Albrechtsen, 2014). Udnyttelse af allerede tilstedeværende mikroorganismer til at fjerne pesticidforureninger kan udgøre en økonomisk effektiv og bæredygtig behandlingsmetode sammenlignet med andre teknologier, fx aktivt kul eller membranfiltrering. Det er især interessant, at der tidligere er påvist en sammenhæng mellem metanoxydation og nedbrydning af pesticidet bentazon, hvor uspecifikke enzymer i metanoxydierende bakterier (MMO) kan igangsætte nedbrydningen via en co-metabolisk proces (Hedegaard, 2018). Da der er flere kemiske lighedspunkter mellem bentazon og chloridazons nedbrydningsprodukter, er det sandsynligt, at denne nedbrydningsstrategi kan overføres fra bentazon til DPC. DMS har en kemisk struktur væsentlig forskellig fra de to andre stoffer, hvorfor det er uvist i hvilket omfang erfaringerne med co-metabolisk nedbrydning kan overføres til DMS.

1.1 Erfaringer fra indledende laboratorieundersøgelser

Der blev i foråret 2018 udført indledende forsøg for at undersøge potentialet for mikrobiologisk nedbrydning af CHL og DPC (Hansen, 2018). Forsøgene blev udført med biomasse fra Stenholt Vandværk og filtersand fra Borre Vandværk samt med relativt høje pesticidkoncentrationer (hhv. 3,4 mg/l og 0,1 mg/l). Resultaterne fra de indledende forsøg indikerede et potentiale for at fjerne DPC. Biomasse fra Stenholt Vandværk kunne fjerne 35 % DPC efter 13 dage (Figur 1), og filtersand fra Borre Vandværk kunne fjerne 30 % DPC ved 14 dages inkubation (Tabel 1). Dog var resultaterne fra de indledende forsøg behæftet med stor usikkerhed bl.a. grundet abiotiske kontroller og analyseusikkerhed. Der blev i indledende undersøgelser på Borre Vandværk, som er berørt af DPC i råvandet, fundet et generelt koncentrationsfald gennem filter og rentvandstank efter en opholdstid på ca. 3 dage. Men disse analyser kunne ikke verificeres i værkets aktuelle indvindings- og driftsforhold.



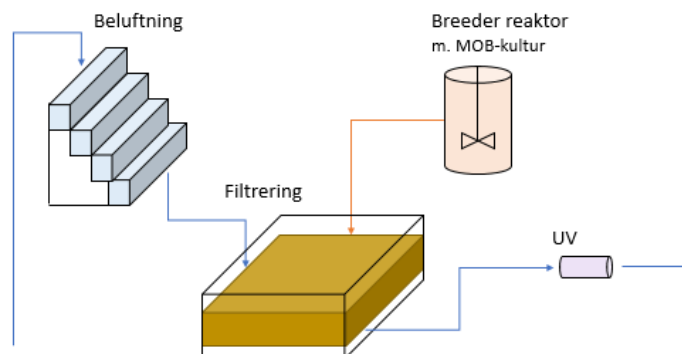
Figur 1: Fjernelse af chloridazon og desphenyl-chloridazon i batch-forsøg af 100 ml vand og 10 ml biomasse fra beluftnings-tank på Stenholt Vandværk (Hansen, 2018).

Tablet 1: Fjernelse af chloridazon, desphenyl-chloridazon and methyl desphenyl-chloridazon i batch-forsøg med filtersand fra primær, sekundær og tertiær filter på Borre vandværk, data efter 14 dages inkubation med 0,1 µg/l pesticid (Hansen, 2018).

		Primær filter	Sekundær filter	Tertiær filter
Chloridazon	+CH4	22 ± 18% (n=3) [*]		7 ± 9% (n=3)
	-CH4	0 ± 1% (n=2)		43 ± 18% (n=2)
Desphenyl-chloridazon	+CH4	29 ± 6% (n=3) [*]	30 ± 2% (n=2) [*]	24 ± 15% (n=3) [*]
	-CH4	18 ± 4% (n=2)		24 ± 6% (n=2) [*]
Methyl-desphenyl-chloridazon	+CH4	22 ± 6% (n=3)		5 ± 1% (n=3)
	-CH4	6 ± 2% (n=2)		8 ± 4% (n=2)

^{*}Baseret på nul fjernelse i abiotiske kontroller

Indeværende projekt blev udformet på baggrund af indikationerne fra de indledende laboratorieundersøgelser, og med afsæt i de tidligere studier om sammenhæng mellem metanoxidation og mikrobiologisk nedbrydning af pesticider. Der blev opstillet en hypotese om, at en mulig ny renseteknologi kan udvikles ved at udnytte den naturlige bakterieflora på danske vandværker. Det kunne fx være gennem en breeder reaktor, der i et separat procestrin kontinuert føder metanoxiderende bakterier til sandfiltrene (Figur 2). Udvikling og det endelige design af en renseteknologi vil dog afhænge af, om der påvises et relevant potentiale, og i så fald hvordan dette kan optimeres.



Figur 2: Eksempel på muligt konceptuel design af renseteknologi baseret på co-metabolisk nedbrydning ved berigelse af eksisterende sandfiltre.

1.2 Projektets formål

Projektets overordnet formål var at undersøge potentialet for mikrobiologisk nedbrydning af DPC og DMS ved en co-metabolisk proces baseret på metanoxidation, med henblik på at udvikle en ny rensemetode til at fjerne DPC og DMS på berørte danske vandværker. Projektet blev struktureret i følgende arbejdsplaner:

Arbejdsplan 1: Screening og 'Proof-of-concept'

I denne arbejdsplan blev screenet for nedbrydningspotentiale for DPC og DMS på 10 forskellige vandværker. Potentialet blev undersøgt i række laboratorieforsøg med filtersand eller bakterie-biomasse fra beluftningsstanke fra udvalgte vandværker, hvilket inkluderede:

- Vandværker hvor forureninger med DPC og/eller DMS er blevet påvist.
- Vandværker der modtager grundvand med høje metankoncentrationer.
- Vandværker med forskellig kemisk sammensætning af råvandet herunder fx koncentration af NVOC og kobber.

Arbejdsplanens screening kortlagde de overordnede muligheder for mikrobiologisk nedbrydning af DPC og DMS dvs. gav et Proof-of-concept for de videre undersøgelser i projektet.

Arbejdsplan 2: Optimering af nedbrydningspotentiale

I denne arbejdsplan blev der undersøgt muligheder for at stimulere nedbrydningen af DPC og DMS via metanoxidation, med henblik på at optimere nedbrydningspotentialet fra Arbejdsplan 1. Her blev det undersøgt, om nedbrydningen kan stimuleres fx ved at øge metankoncentrationen. Laboratorieforsøg undersøgte, hvorvidt følgende parametre kunne forbedre nedbrydningspotentialet:

- Tilsætning af metan
- Substrat-forhold og doseringsstrategi
- Kobber-koncentration og MMO udtrykt i MOB

Arbejdsplanen undersøgte desuden optimering af nedbrydningspotentialet gennem laboratorieforsøg med en opdyrket kultur af metanoxiderende bakterier (MOB) for at kortlægge, hvorvidt der er sammenhæng mellem metanoxidation og nedbrydning af pesticidnedbrydningsprodukterne. MOB kulturen blev undersøgt ift. substrat-forhold og doseringsstrategi

Arbejdsplan 3: Skalérbarhed og koncept for implementering af nedbrydningspotentiale

Med afsæt i resultaterne fra Arbejdsplan 1 og 2 blev der vurderet muligheder for at udvikle en rensemetode baseret på co-metabolisk fjernelse af pesticidnedbrydningsprodukter. Laboratorieforsøg undersøgte hvorvidt potentialet kan overføres fra ét vandværk til ét andet med udgangspunkt i af løse udfordringen på Staurbyskov Vandværk. Skalérbarheden blev vurderet ved at omregne det observerede potentiale fra laboratorieforsøg til en forventet hastighed i fuldskala dvs. på et traditionelt dansk vandværk.

3. Screening af nedbrydningspotentiale

Nedbrydningspotentialet er undersøgt i en række batchforsøg. Forsøgene i screeningen er generelt udført med samme metode, afsnit 3.2. Fælles for disse forsøg er, at der er anvendt realistiske koncentrationer af DPC og DMS (~2 µg/L), og at der er udført forsøg med og uden tilsætning af biologisk materiale (filtersand eller bakterie-biomasse indsamlet fra beluftningstanke). Ydermere er stoffet bentazon inkluderet som positiv kontrol, da tidligere studier har vist, at stoffet kan nedbrydes co-metabolisk via MOB i sandfiltre (Hedegaard, 2018).

3.1 Udvalgelse af vandværker

Der er udført nedbrydningsforsøg med materiale fra 10 forskellige danske vandværker (Tabel 2). Vandværkerne i screeningen er udvalgt på baggrund af én eller flere af følgende kriterier:

Metan: Det er sandsynligt, at vandværker, der behandler råvand med højt indhold af metan, har metanoxiderende bakterier (MOB) på vandværket. Tilstedeværelsen af MOB på vandværker med højt indhold af metan i råvandet vil bl.a. afhænge af iltningssystemets effektivitet. MOB kan vokse enten i selve beluftningstanken, hvorefter MOB efterfølgende transporteres med vandet til filtrene. Såfremt beluftningssystemet ikke tilstrækkeligt fjerner alt metan fra råvandet, kan MOB vokse direkte i sandfiltrene. Tilstedeværelsen af MOB på et vandværk vil udover beluftningssystemet også afhænge af vandets øvrige kemiske sammensætning.

Kobber: Koncentration af kobber kan påvirke enzymet Metan Mono-Oxygenasen (MMO), der er ansvarlig for det første trin i metanoxidationen. MMO findes i to forskellige former hhv. partikulært (pMMO) og opløseligt (sMMO). pMMO kan co-metabolisk initiere nedbrydningen af mindre organiske forbindelser, hvorimod sMMO, har et bredere potentiale for co-metabolisk nedbrydning fx af aromatiske forbindelser (Semrau et al., 2010). Det antages, at MOB på vandværker er oligotrofe, dvs. at de trives under lave koncentrationer af primært substrat og næringsstoffer, svarende til forholdene i sandfiltre. Oligotrofe MOB tilhører ofte type II MOB, som i de fleste tilfælde vil have pMMO enzymet. Dog er nogle type II MOB i stand til at udtrykke begge MMO enzymer, og for disse vil koncentrationen af kobber afgøre, hvilket MMO der produceres. En lav koncentration af kobber vil favorisere dannelse af sMMO frem for pMMO. Det formodes derfor, at koncentrationen af kobber kan påvirke hvilke stoffer, der potentielt kan nedbrydes co-metabolisk af MOB.

Organisk stof: Højt indhold af organisk stof kan stimulere væksten af heterotrofe bakterier (HB), hvilket kan øge den generelle biologiske aktivitet på vandværker bl.a. i sandfiltrene. HB kan potentielt bidrage til den mikrobiologiske nedbrydning af nogle mikro-forureninger i samspil med MOB (Benner et al., 2015). Et højt indhold af organisk stof er ofte koblet til tilstedeværelsen af fx metan (Christensen et al., 2015).

D. Pesticidnedbrydningsprodukter: En kontinuert belastning af pesticidnedbrydningsprodukter fx DPC på et vandværk kan potentielt give anledning til vækst og/eller udvikling af direkte nedbrydere, der biologisk kan omsætte mikro-forureningen. Da koncentrationerne af pesticidnedbrydningsprodukterne er relativt lave, vil den direkte omsætning dog være mindre sandsynlig, men det er set tidligere fx ved omsætning af phenoxysyre på Kerteminde Vandværk efter en forureningsbelastning i 3-6 måneder (Hedegaard et al., 2014).

Tabel 2: Oversigt over udvalgte vandkvalitetsparametre på de undersøgte vandværker. Data stammer fra udtræk fra Jupiter 1) eller 2) analyser foretaget på DTU af a) højeste koncentration målt i aktiv boring, b) top af filter eller c) afgang vandværk.

	NVOC ^{1c)} (mg/L)	Metan ^{1a)} (mg/L)	Kobber ^{2b)} (µg/L)	DPC ^{1c)} (µg/L)	DMS ^{1c)} (µg/L)	Kommentar (ifbm. prøvetagning)
Stenholt	2,4	<33	0,05	<0,01	<0,01	
Borre	4,1	<22	-	0,12	<0,01	Boringer med forskellig karakteristika
Sjælsø II	2,3	<9,9	0,06	<0,01	<0,01	Udskift af blufningssystem
Staubyskov	1,2	<0,5	0,11	0,05	0,095	Reduceret drift pga. DPC og DMS
Ullerup	1,6	<30	<0,02	-	-	Ammoniumfjernelse tidl. udfordret
Nykøbing F.	2,2	<8,0	0,02	0,077	<0,01	Boringer med forskellig karakteristika
Skælskør N.	1,6	<0,01	<0,02	0,039	<0,01	
Skovmølle	2,2	<0,06	0,08	<0,01	0,065	Ændret indvinding pga. DMS
Kerteminde	2,8	-	0,05	0,062	<0,01	
Tolne	1,3	<2,8	0,07	<0,01	<0,01	
Bredkær	1,7	<18	0,03	<0,01	<0,01	

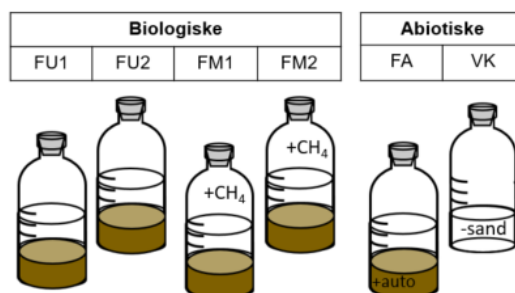
3.2 Metodebeskrivelse for screening af nedbrydningspotentiale

Princip: Princippet bag forsøgene er at lade biologisk aktivt filtersand komme i kontakt med vand med pesticidnedbrydningsprodukter (DMS og DPC), og undersøge, hvorvidt koncentrationen af disse ændres over tid som resultat af vandets kontakt med filtersandet og dets iboende mikroorganismer. Abiotiske (autoklaverede) og positive kontroller (tilsat bentazon) anvendes til at vurdere, hvorvidt koncentrationsændringer indikerer en potentiel biologisk nedbrydning.

Forsøgsbeskrivelse: Opstillingen omfatter batchforsøg i 300 ml serumflasker lukket med teflon-coatede gummipropper og metalskruelåg. Der opstilles som minimum seks batchforsøg (flasker) for hvert vandværk inkl. kontroller (Figur 3 og Tabel 3). Alle flasker indeholder 100 ml vand afgang vandværk, som ved forsøgets start tilsættes 2 µg/L pesticidstof hhv. DMS, DPC og Bentazon. Der opstilles fire flasker for at undersøge nedbrydningspotentialet med 100 g filtersand hhv. med (FM) og uden metan (FU) (2-5 mg CH₄/l). Der opstilles desuden to kontroller: dels en abiotisk kontrol (FA) med sand, der har været autoklaveret 3 gang (af 20 min ved 121°C og 1 atm) og dels en kontrol alene med vand (VK) dvs. uden tilsætning af filtersand. Alt glasudstyr er syrevasket og glødet (550°C i 4 timer), øvrigt materiale er enten autoklaveret eller afvasket med HOCl (1%). Flaskerne er opstillet i Laminar Flow Bænk, for at minimere kontaminering af forsøgsopstillingen.

Tabel 3: Forsøgsopstilling ved screening af potentiale for biologisk nedbrydning af DMS og DPC.

#	ID	Vandværk	Sand [g]	Vand [ml]	DMS [µg/l]	DPC [µg/l]	Bentazon [µg/l]	CH ₄ [mg/l]	Autoklaveret (3x 121°C af 20 min)
1-2	FU	A	100	100	2	2	2	-	-
3-4	FM	A	100	100	2	2	2	5	-
5	FA	A	100	100	2	2	2	-	+
6	VK	A	-	100	2	2	2	-	-



Figur 3: Design af batchforsøg til screenings af nedbrydningspotentiale. FU: Filtersand uden metan, FM: Filtersand med metan, FA: Autoklaveret abiotisk kontrol, og VK: Kontrol kun med vand.

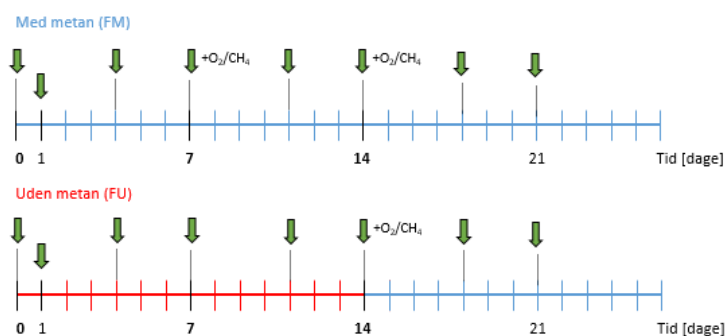
Arbejdsprocedure:

1. Under prøvetagning på vandværket indsamles sand fra de øverste 10 cm i et sandfilter samt vand afgang værk. Hvis muligt indsamles bakterie-biomasse fra beluftningstanke ved at skrabe det øverste biofilm af i vandkanten. Materialerne opbevares i tætlukkede, rene beholdere ved 10°C indtil forsøget opstilles. Det tilstræbes, at forsøgene opsættes inden for få dage efter indsamling.
2. Indledningsvist fyldes alle flasker med 100 g filtersand, der afvejes via en vægt og tilføres direkte til flaskerne under afvejning. Sandet drænes så vidt muligt inden afvejning.
3. De abiotiske kontroller autoklaveres tre gange (hver i 20 min ved 121°C og 1 atm). Mellem hver autoklavering stilles flaskerne på køl min 10°C i 5-10 timer.
4. Der tilføres 100 ml vand til alle flasker, som afvejes på en vægt (100 g).
5. Metan (CH₄) tilføjes flaskerne i det afstemte volumen svarende til en koncentration af 2-5 mg/l i vandfasen. Flasker, der tilføres CH₄, tilføres endvidere ilt (O₂) i 2x det tilsatte CH₄ volumen.
6. Ved forsøgets start (t = 0) tilsættes pesticidstoffer fra en stamopløsning i et volumen svarende til en koncentration i vandfasen på 2 µg/l.

Prøvetagning: Ved prøvetagning vendes flaskerne forsigtigt inden der udtages 2 ml væske. Ved prøvetagning erstattes de 2 ml væske af 2 ml atmosfærisk luft. Væsken filtreres gennem et 0,2 µm nylon filter og overføres til et 2 ml mørkt, hætteglas (Figur 4). Flaskerne prøvetages med en stabil frekvens over forsøgsperioden, gerne 1-2 gange om ugen (Figur 5). Der udtages minimum to prøver inden for de første 2 timer efter pesticidtilsætning (t = 0), og der udtages prøver på hhv. dag 7 og dag 14 til sammenligning på tværs af screeningsforsøg. Forsøget afsluttes efter max 21 dage. Ved sidste prøvetagning udtages 2-3 prøver fra hver flaske.



Figur 4: Prøvetagningsprocedure ved screeningsforsøg.



Figur 5: Prøvetagningsplan ved screeningsforsøg.

Inkubering og monitorering: Flaskerne inkuberes på rystebord ved 120 rpm og 10°C. Gasfasen analyseres for O₂ og CH₄ via GC-analyse umiddelbart før prøvetagning af væsken. Såfremt koncentrationerne falder markant tilsættes der nyt O₂ og CH₄. Dette vurderes løbende gennem forsøgsperioden (Figur 5). Gasfasen analyseres før og efter en evt. tilsætning.

Opbevaring og analyse af væskeprøver: Prøverne opbevares i køleskab ved ca. 5°C, indtil de kan analyseres samlet ved forsøgets afslutning. Den endelige prøverække tilfældiggøres forud for LC MS/MS analysen, så den ikke følger den kronologiske prøvetagning.

3.2.1 Metodeudvikling

Fortolkningen af de indledende resultater fra nedbrydningsforsøgene var delvist udfordret af analyse- og metodeusikkerheder. Derfor blev der løbende udviklet på forsøgsdesign fx i forhold til prøveudtagning og –opbevaring, abiotiske kontroller samt vurdering af matrixeffekt på den kemiske analyse (Bilag 1). Det har bl.a. medført, at den relative usikkerhed på pesticidanalysen er reduceret markant (så den relative standard afvigelse (RSD) er reduceret fra ca. 25 % til 5 %). Derudover er forsøgsdesign og prøveudtagningsprocedure blevet optimeret og standardiseret, hvilket har reduceret variationen blandt replikaterne betydeligt i batchforsøgene. Dette har styrket robustheden i nedbrydningsforsøgene, som kommer til udtryk i en bedre validering af potentialet for nedbrydning af DPC og DMS.

3.3 Resultater fra batchforsøg i screeningen

Resultaterne fra screening af nedbrydningspotentialet er vurderet for hvert af de 10 undersøgte vandværker samt Borre Vandværk fra de indledende undersøgelser. Her er ændringen over tid estimeret for pesticidnedbrydningskoncentrationen normaliseret i forhold til startkoncentrationen og sammenlignet på tværs af batchforsøgene, for de relevante abiotiske kontroller og den overordnede analyse- og metodeusikkerhed, for at vurdere potentialet for biologisk nedbrydning.

3.3.1 Stenholt Vandværk

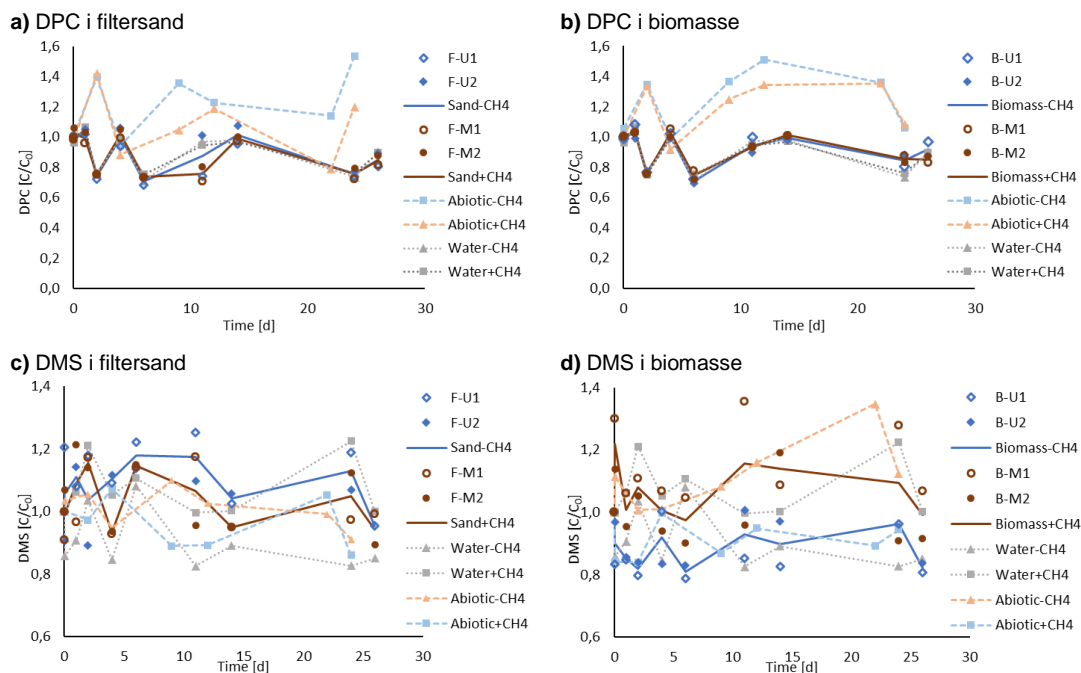
Karakterisering af vandværk:

- Høj koncentration af metan i råvandet, ~15 mg/l (Milanovic & Sykta, 2017).
- Der er observeret orangefarvet biomasse (indikerer tilstedeværelse af MOB) i beluftningstanke og i sandfiltre.
- Der er ikke gjort fund af DPC, DMS eller bentazon i råvand, som behandles på værket.

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Der er tidligere observeret potentiale for nedbrydning af bentazon med biomasse fra beluftningstanke samt påvist sammenhæng med metanoxidation (Hedegaard, 2018).

- Indledende nedbrydningsforsøg med relativt høje koncentrationer (mg/L) indikerede fjernelse af CHL (10%) og DPC (35%) efter 14 dages inkubation med biomasse fra beluftningstank (Figur 1) (Hansen, 2018).
- Screeningsforsøg med lave koncentrationer ($\mu\text{g/L}$) viste ikke fjernelse af DPC eller DMS, hverken ved brug af biomasse eller filtersand fra Stenholt Vandværk (Figur 6).



Figur 6: Fjernelse af DPC og DMS ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand (100g/100 ml vand) og biomasse (10 ml/100 ml vand) fra Stenholt Vandværk. Duplikater angivet med åbne og lukkede symboler.

3.3.2 Borre Vandværk

Karakterisering af vandværk:

- Vandværk med to borer med forskellige karakteristika for råvandet med hhv. høj koncentration af metan, $\sim 15 \text{ mg/l}$ og ingen pesticidfund, og omvendt (Hansen, 2018).

Resultater fra indledende undersøgelser:

- Op til 25% nedbrydning af bentazon i filtersand med størst nedbrydning i primær filter dvs. potentiel sammenhæng med metanoxidation (Hansen, 2018)
- Indikation af nedbrydningspotentiale for CHL, DPC og MDPC trods usikkerheder inkl. problemer med abiotiske kontroller (Tabel 1) (Hansen, 2018).

3.3.3 Sjølsø Vandværk (anlæg II)

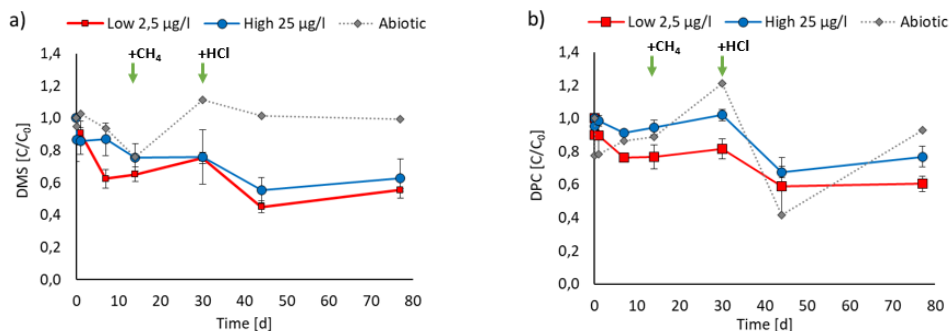
Karakterisering af vandværk:

- Ingen fund af pesticider eller nedbrydningsprodukter i råvand (Jupiter, 2019).
- Høje koncentrationer af metan i råvandet, $\sim 10 \text{ mg/l}$ (Milanovic & Sykyta, 2017).

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Filtersand har tidligere vist nedbrydningspotentiale for bentazon med sammenhæng til metanoxidation (Milanovic & Sykyta, 2017 og Hedegaard, 2018).

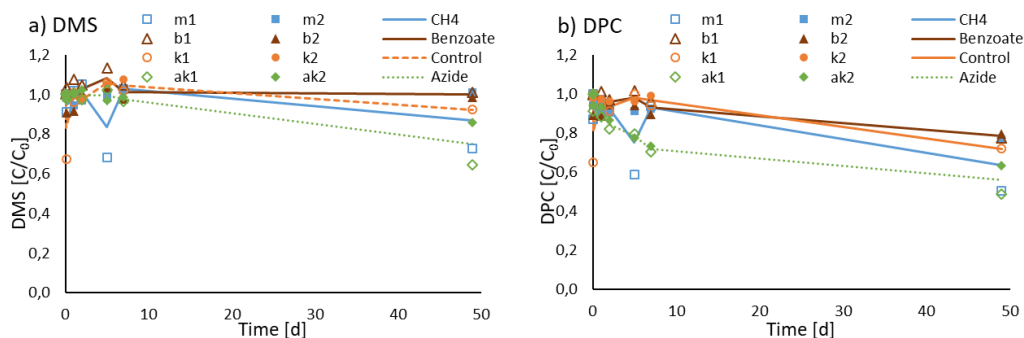
- Indikation af nedbrydning af DMS og DPC med filtersand, trods udfordringer med abiotiske kontroller. Observeret fjernelse af DMS på 35 ± 6 % og fjernelse af DPC på 23 ± 10 % efter 14 dage (Figur 7).
- Mulig effekt af tilsætning af metan på potentialet for fjernelse baseret på fjernelse efter 49 dage (Tabel 4 og Figur 8) (Nielsen & Pedersen, 2019).



Figur 7: Fjernelse af a) DMS og b) DPC i batch-forsøg af 100 ml vand og 100 g filtersand fra Sjælsø Vandværk anlæg II ved hhv. 25 og 2,5 µg/l pesticid. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

Tabel 4: Fjernelse af DPC og DMS i batch-forsøg med vand og filtersand fra Sjælsø Vandværk anlæg II, data efter 7 og 49 dages inkubation med 2 µg/l pesticid (Nielsen & Pedersen, 2019).

		-CH4	+CH4 (2 mg/L)	+ azid (2 g/L)
DPC	7 [d]	3 % (n=2)	7 % (n=2)	28 % (n=2)
	49 [d]	28 % (n=2)	36 % (n=2)	44 % (n=2)
DMS	7 [d]	0 % (n=2)	0 % (n=2)	3 % (n=2)
	49 [d]	8 % (n=2)	13 % (n=2)	25 % (n=2)



Figur 8: Fjernelse af a) DMS og b) DPC i batch-forsøg af 100 ml vand og 100 g filtersand fra Sjælsø Vandværk samt 2 µg/l pesticid (Nielsen & Pedersen, 2019). Duplikater angivet med åbne og lukkede symboler.

3.3.4 Staurbyskov Vandværk

Karakterisering af vandværk:

- Fund af DPC (0,14-2,4 µg/l) og MDPC (0,013-0,16 µg/l) i råvandet, og i december 2017 gav kommunen dispensation til at anvende Staurbyskov som nødforsyning, derfor har værket kørt med reduceret drift i perioden.

- Løbende prøvetagning efter fund af DPC i råvand viste desuden tilstedeværelse af DMS i afværgboringer (i koncentrationer op til 0,22 µg/l).
- Lav koncentration af metan i råvandet, ~0,02-0,05 mg/L (Jupiter, 2019).

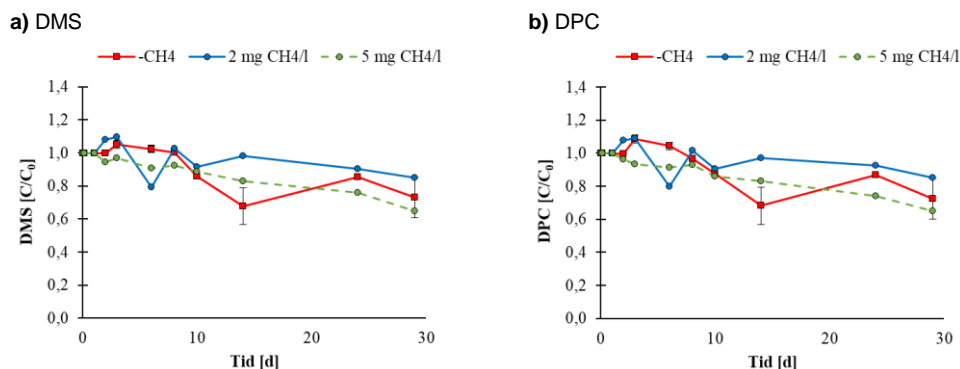
Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Indikation af fjernelse med filtersand fra Staurbyskov vandværk, foruden naturligt forekommende pesticidnedbrydningsprodukter også tilsat 2 µg/L. Efter 14 dages inkubation er der fjernet 27 % af DPC og 30 % af DMS. Der er ikke indikation af øget fjernelse ved tilsætning af metan (Tabel 5 og Figur 9) (Nielsen & Pedersen, 2019).

Tabel 5: Fjernelse* af DPC og DMS i batch-forsøg med vand og filtersand fra Staurbyskov vandværk, data efter 14 dages inkubation med 2 µg/l pesticid (Nielsen & Pedersen, 2019).

	-CH ₄	+CH ₄ (2 mg/L)	+CH ₄ (5 mg/L)
DPC	27 % (n=2)	10 %	14 %
DMS	30 % (n=2)	9 %	15 %

*Baseret på nul fjernelse i abiotiske kontroller



Figur 9: Fjernelse af DMS og DPC i batch-forsøg med vand og filtersand fra Staurbyskov Vandværk, 2 µg/l pesticid og naturligt forekomne metabolitter (Nielsen & Pedersen, 2019). Errorbar er afvigelsen mellem duplikater.

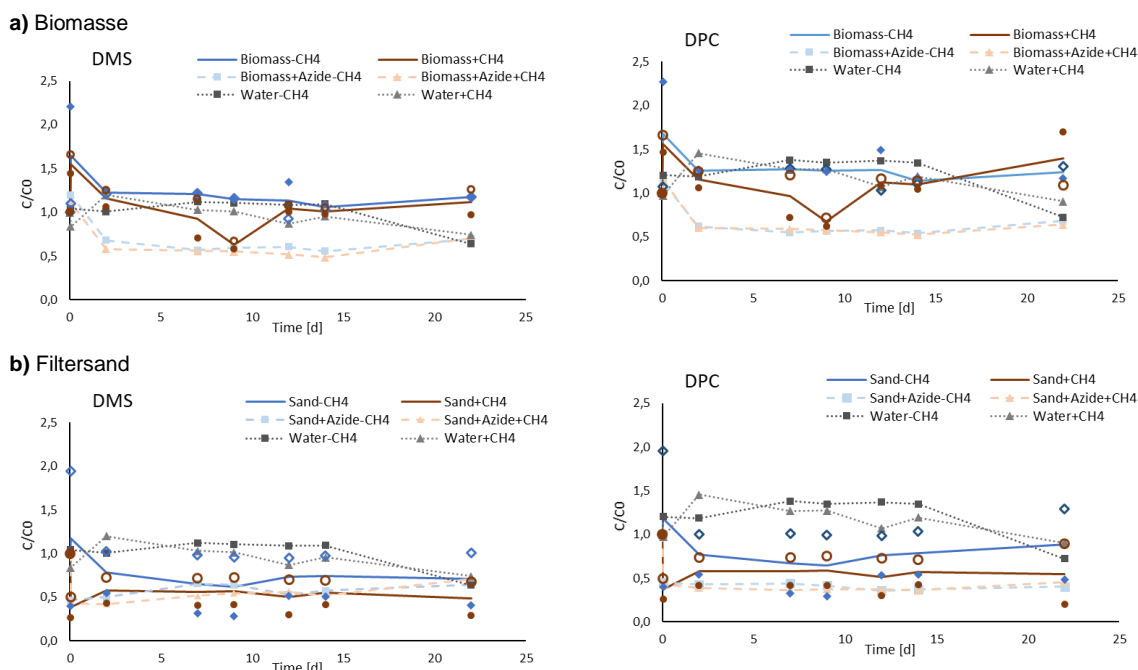
3.3.5 Ullerup Vandværk

Karakterisering af vandværk:

- Højt indhold af metan i råvandet, ~15 mg/L (Milanovic & Sykyta, 2017).
- Høj koncentration af organisk stof på vandværket, >4 mg/L afgang værk (Jupiter, 2019).
- Der har tidligere været observeret høje koncentrationer af kobber, ~2µg/L (Milanovic & Sykyta, 2017).
- Der har tidligere været udfordringer med ammoniumfjernelse i filtre forud for prøvetagning.

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Tidligere nedbrydningsforsøg med bentazon viste et lille potentiale, som ikke blev forsøgt stimuleret med tilsætning af metan (Milanovic & Sykyta, 2017).
- Nedbrydningsforsøg med filtersand og biomasse fra beluftningstank indikerede ikke fjernelse af DPC eller DMS (Figur 10). Forsøget var forbundet med høj usikkerhed (RSD ved analysen ~25 %).



Figur 10: Fjernelse af DMS og DPC ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med a) biomasse (10 ml/100 ml vand) og b) filtersand (100g/100 ml vand) fra Ullerup Vandværk. Duplikater angivet med åbnede og lukkede symboler.

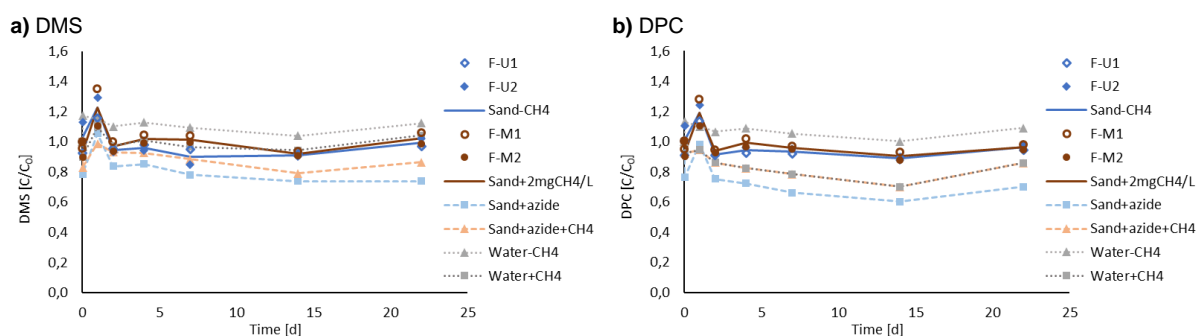
3.3.6 Nykøbing Falster Vandværk

Karakterisering af vandværk:

- Indhold af metan i nogle boringer (~5 mg/L) men ikke i andre (Jupiter, 2019).
- Vandværket har gjort fund af DPC i råvandet i enkelte boringer (Jupiter, 2019).

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Ingen tidligere nedbrydningsforsøg på vandværket.
- Nedbrydningsforsøg med filtersand indikerede ikke fjernelse af DPC eller DMS, da koncentrationer er målt stabile over en inkubationsperiode på 22 dage (Figur 11).



Figur 11: Fjernelse af DMS og DPC ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Nykøbing Falster Vandværk. Duplikater angivet med åbnede og lukkede symboler.

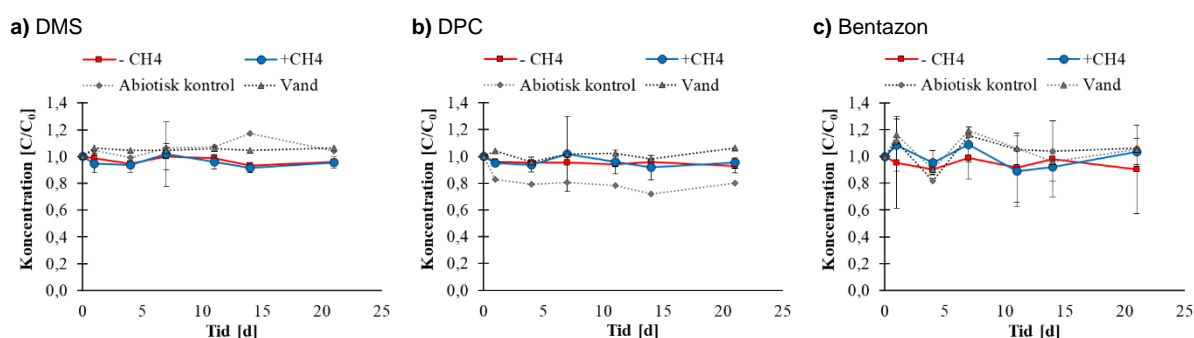
3.3.7 Skælskør Nordre Vandværk

Karakterisering:

- Vandværket var et af de første, som påviste DPC i råvandet i 2017, hvorfor det må formodes at filterne har været belastet med DPC over en længere periode (Jupiter, 2019).
- Metanindholdet i råvandet var lav, < 0,02 mg/L (Jupiter, 2019).

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Ingen tidligere nedbrydningsforsøg på vandværket.
- Nedbrydningsforsøg med filtersand indikerede ikke fjernelse af DPC, DMS eller Bentazon, da koncentrationer er stabile gennem en inkubationsperiode på 21 dage (Figur 12).
- Koncentrationen af DPC gennem vandværk faldt fra udløb filter til afgang vandværk med 45 % over perioden med ophold i rentvandstanken (Tabel 6). Fjernelsen er ikke verificeret ift. aktuelle indvindings- og driftsforhold.



Figur 12: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Skælskør Vandværk. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

Tabel 6: Målte koncentrationer af Desphenyl-chloridazon (DPC) gennem Skælskør Vandværk.

	Råvand	Indløb filter	Udløb filter	Afgang
DPC [$\mu\text{g/l}$]	0,110	0,111	0,125	0,068

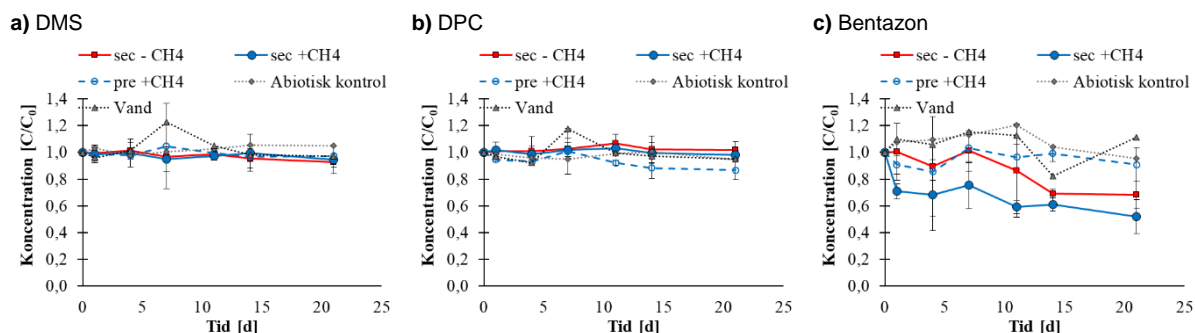
3.3.8 Skovmølleværket, Svendborg

Karakterisering af vandværk:

- Vandværket har haft udfordringer med forhøjede koncentrationer af DMS i råvandet siden 2018 (op til $0,5 \mu\text{g/l}$ i enkelte borer) og har derudover observeret DPC og CTA i enkelte borer (Jupiter, 2019).
- Indhold af metan råvandet er lav, < $0,06 \text{ mg/L}$ (Jupiter, 2019).

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Ingen tidligere nedbrydningsforsøg på vandværket.
- Nedbrydningsforsøg med filtersand har ikke indikeret fjernelse af DMS. Potentiel fjernelse af DPC kun indikeret for sand fra for-filter 12 % efter 14 dage. Potentiel fjernelse af bentazon kun for sand fra efterfilter 39 % efter 14 dage, og en mulig øget fjernelse ved tilsat metan (Figur 13).



Figur 13: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Skovmølleværket, Svendborg. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

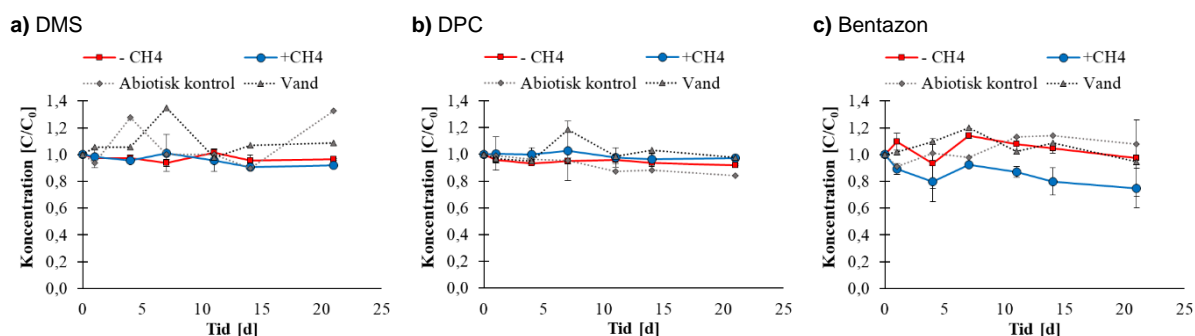
3.3.9 Kerteminde Vandværk

Karakterisering af vandværk:

- Vandværket var et af de første, som påviste DPC i råvandet i 2017, hvorfor det må formodes, at filterne har været belastet med DPC over en længere periode (Jupiter, 2019).
- Indhold af metan i råvandet er ikke målt, og det må formodes lavt/under detektionsgrænsen.
- Relativt høj koncentration af organisk stof, $\sim 3 \text{ mg/L}$ afgang værk (Jupiter, 2019).
- Der er observeret høje koncentrationer af kobber, $\sim 26 \mu\text{g/L}$ afgang værk (Jupiter, 2019)

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Der er tidligere observeret potentiale for nedbrydning af phenoxysyre (MCP) på værket efter en længere periode med belastning heraf blev indløbskoncentrationen ikke genfundet i udløb af filteret (Hedegaard et al., 2014)
- Nedbrydningsforsøg med filtersand har ikke indikeret fjernelse af DPC og DMS. Potentiel fjernelse af Bentazon kun ved tilsætning af metan (Figur 14).



Figur 14: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Kerteminde Vandværk. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

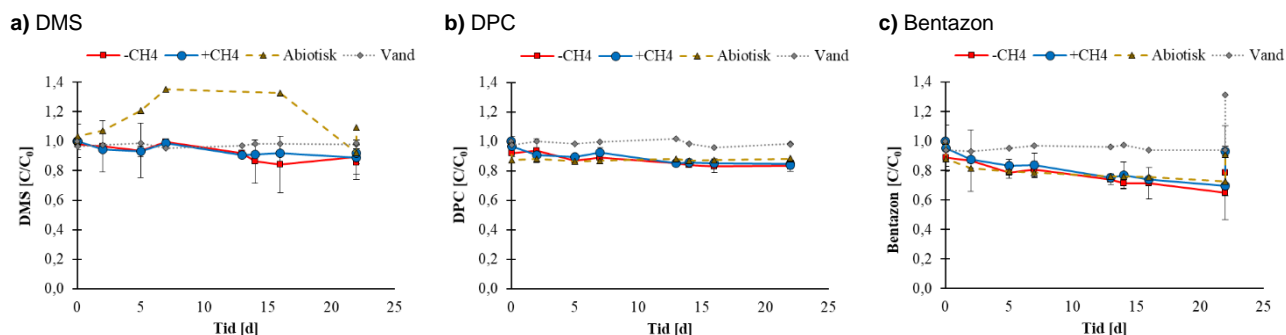
3.3.10 Tolne Vandværk

Karakterisering af vandværket:

- Vandværket har enkelte borer med indhold af metan, $\sim 3 \text{ mg/L}$ (Jupiter, 2020).
- Vandværket har tidligere været udfordret af orme i sandfilterne, hvilket blev koblet til et højt indhold af organisk stof (Christensen et al., 2015).
- Der er ikke påvist pesticidrester i råvand på værket (Jupiter, 2020).

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Ingen tidligere nedbrydningsforsøg på vandværket.
- Nedbrydningsforsøg med filtersand har ikke indikeret fjernelse af DPC og DMS. Potentiel fjernelse af Bentazon ikke påvirket af tilsætning af metan (Figur 15).



Figur 15: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Tolne Vandværk. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

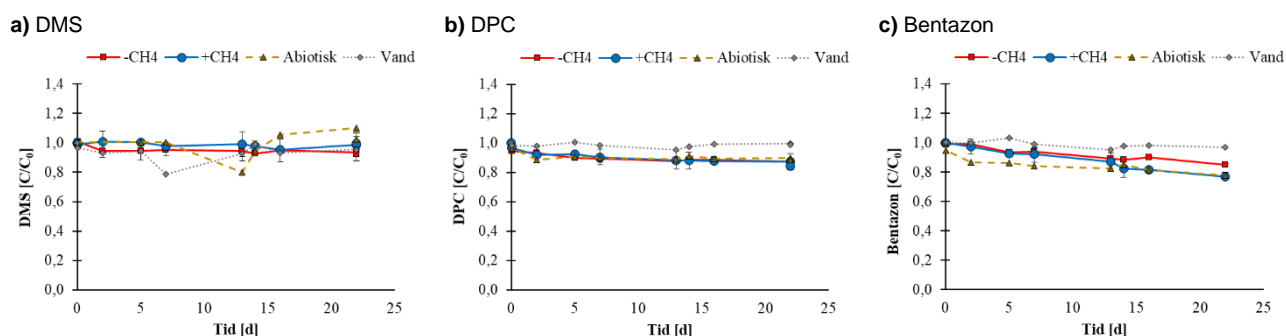
3.3.11 Bredkær Vandværk

Karakterisering af vandværket:

- Vandværket har boreriger med højt indhold af metan, $\sim 18 \text{ mg/L}$ (Jupiter, 2020).
- Der er ikke gjort fund af pesticidnedbrydningsprodukter i råvand på værket (Jupiter, 2020).

Resultater fra nedbrydningsforsøg:

- Ingen tidligere nedbrydningsforsøg på vandværket.
- Nedbrydningsforsøg med filtersand har ikke indikeret fjernelse af DPC og DMS. Potentiel fjernelse af Bentazon ikke påvirket af tilsætning af metan (Figur 16).



Figur 16: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Bredkær Vandværk. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

3.4 Opsamling af resultater fra screeningen

Screeningen viste, at materiale fra nogle vandværker har potentiale for at fjerne DPC og DMS (Tabel 7). På den anden side har screeningen også påvist, at materiale fra andre vandværker ikke har potentiale for at fjerne pesticidnedbrydningsprodukterne. Potentialet er vurderet ud fra et generelt målt fald i koncentrationerne af DPC og DMS over forsøgsperioden. Abiotiske kontroller har generelt vist et la-

vere fald, end biologisk aktive forsøg. Men da der er vist et fald i abiotiske kontroller, kan der ikke entydigt afklares, at fjernelsen skyldes en biologisk nedbrydning. Derfor er de efterfølgende fjernelser (angivet i %) ikke korrigeret for evt. abiotisk fjernelse.

Det største nedbrydningspotentiale i screeningen blev identificeret for Sjælsø Vandværk (anlæg II). Her blev der observeret en fjernelse af DPC på 23 ± 11 % og en fjernelse af DMS på 35 ± 5 % efter 14 dages kontakt med filtersand. Generelt var nedbrydningspotentialet større for materiale udtaget fra værker med naturligt indhold af metan i råvandet. Undersøgelserne fandt ikke nedbrydningspotentiale i materiale fra vandværker med særlig kraftig pesticidforurening, men uden metan i råvandet. Adaptationsforsøg, hvor de mikrobiologiske prøver blev eksponeret til DPC eller DMS i længere tid (~2 måneder) for at tilvænne og dermed stimulere nedbrydningen, viste ingen umiddelbar effekt. Dette understøtter hypotesen om, at nedbrydningspotentialet skyldes co-metabolisk nedbrydning baseret på metanoxidation, hvor denne adaptationsstrategi ikke vil have effekt.

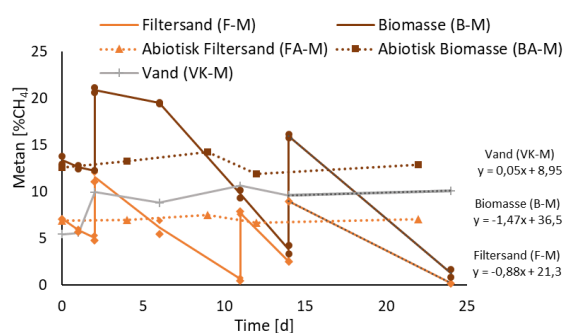
Tablet 7: Oversigt over resultater fra screening af potentialet for mikrobiologisk nedbrydning af DPC, DMS og bentazon fra laboratorieforsøg. Fjernelse er angivet som fraktion af startkoncentrationen ($1-C/C_0$) efter 14 dages inkubation. Ved (-) er fjernelsen ikke undersøgt. Forsøgene er udført med en startkoncentration på 2 µg/L, og med 100 g filtersand eller 10 mL bakterie-biomasse per 100 mL vand afgang værk. Der er ikke korrigeret for abiotisk fjernelse. RSD er angivet for duplikater.

Vandværk	Fjernelse af pesticidstof			Biologisk aktivitet ¹⁾		Kommentar
	[1-C/C ₀]			[mg/l/d]		
	DMS	DPC	Bentazon	O ₂	CH ₄	
Stenholt	0,06	0,02	-	0,94	0,41	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0 og 10 vol.%).
	±4,5%	±4,5%		±0,7%	±3,3%	
	-0,05	0,04	-	-	-	Biomasse. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0 og 20 vol.%).
	±8,0%	±4,9%				
Borre ²⁾	-	0,29	-	-	-	Filtersand. Sand fra forskellige filtre (primær, sekundær og tertiær) og tilsætning af 15-20 vol. % CH ₄ .
Sjælsø II	0,35	0,23	-	0,31	0,30	Filtersand. Ingen tilsætning af CH ₄ .
	±4,6%	±10,7%		±25%	±3%	
Staurbyskov	0,32	0,32	-	0,18	0,15	Filtersand. Mulig effekt af tilsat CH ₄ (0 og 20 vol.%).
	±7,7%	±8,7%				
Ullerup	0,06	-0,02 ³⁾	-	0,26	0,14	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0 og 10 vol.%).
		±25%		±2,1%	±1,5%	
	0,24	0,09	-	-	-	Biomasse. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0 og 10 vol.%).
	±2,3%	±1,2%				
Nykøbing Falster	0,25	0,25	-	0,32	0,18	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0, 10 og 25 vol.%).
	±7,6%	±13,4%		±9,1%	±4,1%	
Skælskør	0,06	0,04	0,08	0,15	0,10	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0 og 20 vol.%).
	±2,1%	±2,0%	±2,9%	±18%	±11%	

Svendborg	0,05 ±7,2%	-0,02 ³⁾ ±7,8%	0,31 ±3,2%	0,08 ±29%	0,07 ±17%	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (0 og 20 vol. %) for DMS og DPC. DPC fjernelse kun i forfilter. Bentazon fjernelse kun i efterfilter og mulig effekt af tilsat CH ₄ (20 vol. %).
Kerteminde	0,04 ±3,9%	0,06 ±2,9%	-0,04 ³⁾ ±3,2%	0,16 ±50%	0,09 ±36%	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ (15 vol.%) for DMS og DPC. Bentazon fjernelse kun ved tilsat CH ₄ (15 vol.%).
Tolne	0,14 ±15%	0,16 ±0,3%	0,29 ±3,8%	0,77 ±0,6%	0,37 ±1,0%	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ for DMS og DPC (0 og 15 vol. %). Mulig effekt af tilsat CH ₄ for bentazon (15 vol. %)
Bredkær	0,07 ±0,5%	0,11 ±0,4%	0,22 ±0,4%	0,98 ±0,1%	0,48 ±3,2%	Filtersand. Ingen effekt af tilsat CH ₄ for DMS og DPC (0 og 15 vol. %). Mulig effekt af CH ₄ for bentazon (15 vol. %).

Noter: 1) Målt via GC-analyse af ilt og metan i gasfasen og omregnet til forbrug i vandfasen, 2) Indledende undersøgelser fra Borre Vandværk er inkluderet i tabellen fra Hansen, 2018, 3) Negative fjernelser betyder, at gennemsnitskoncentrationen er estimeret højere end startkoncentrationen inkl. analyse- og metodeusikkerhed.

I batchforsøg, hvor der blev doseret metan, blev metanforbruget stimuleret, så metanforbruget blev hurtigere, hvilket indikerede tilstedeværelse og aktivitet af metanoxiderende bakterier (MOB). Dette er observeret for både filtersand og bakterie-biomasse fra beluftningstanke (Figur 17). De begrænsede forsøg med dosering af metan som del af screeningen, viste ikke umiddelbart en optimering af fjernelsen af DPC eller DMS.



Figur 17: Metankoncentrationer målt i batchforsøg i screeningen af nedbrydningspotentiallet med hhv. filtersand og bakterie-biomasse fra Stenholt vandværk.

I screeningsforsøgene blev fjernelsen af DPC og DMS estimeret til hhv. 23 % og 35 % efter 14 dages kontakt med filtersand (startkoncentration på 2,5 µg/L). Batchforsøgene er udført under standardiserede testforhold, der på visse punkter afviger fra relevante driftsforhold i dansk drikkevandsbehandling fx ift. opholdstid og belastning af sandfiltre. Selvom der er observeret et potentiale, viste batchforsøgene ikke en fuld fjernelse af pesticidnedbrydningsprodukterne. Det er derfor relevant at undersøge

mulighederne for en optimering af nedbrydningspotentialet. Skalérbarheden af det observerede potentiale vurderes nærmere i afsnit 5.2.

3.5 Konklusioner fra screeningen

Laboratorieundersøgelserne fra screeningen har ført til følgende konklusioner

- Biologisk materiale fra nogle vandværker har potentiale til at fjerne DPC og DMS. Det er generelt et fald i koncentrationen over tid som resultatet at kontakt mellem pesticidholdigt drikkevand og filtersand.
- Biologisk materiale fra vandværker som behandler råvand med betydelig forurening af pesticidnedbrydningsprodukterne DPC eller DMS viste generelt ikke potentiale for fjernelse af stofferne. Adaptionsforsøg, hvor det biologiske materiale har været i kontakt med pesticidforurennet vand over en længere periode (~2 måneder), viste heller ikke et øget potentiale for at fjerne stofferne. Disse resultater indikerer, at den observerede fjernelse ikke skyldes en direkte biologisk nedbrydning.
- Biologisk materiale fra vandværker med højt indhold af metan i råvand har generelt et større potentiale for at fjerne pesticidnedbrydningsprodukterne. Dette tyder på, at en evt. biologisk nedbrydning kan være co-metabolisk og baseret på metanoxidation.
- Det største potentiale for fjernelse er observeret i biologisk materiale fra Sjælsø Vandværk (anlæg II). Her blev der fundet en fjernelse af DPC på 23 % og en fjernelse af DMS på 35 % efter 14 dages kontakt med filtersand.
- Kontrolforsøg uden filtersand har i screeningen af nedbrydningspotentialet hverken brugt ilt eller metan. Dette indikerer, at der ikke er betydelig biologisk aktivitet i drikkevandet alene, som biologisk kan nedbryde pesticidnedbrydningsprodukterne.
- Koncentrationen af pesticidnedbrydningsprodukterne forbliver stabil over tid i kontrolforsøg uden filtersand, så fjernelsen i forsøgene med biologisk materiale fra vandværker skyldes det tilsatte materiale.
- Metanoxiderende bakterier til stede i filtersand inhiberes ved autoklavering eller kemikalietilsætning (azid eller zink), da abiotiske kontroller ikke forbruger metan.
- De abiotiske kontroller forbruger ilt, hvilket enten kan skyldes, at der fortsat er heterotrofe mikroorganismer til stede efter autoklavering eller kemikalietilsætning, eller at filtersandet i sig selv har et kemisk iltforbrug.
- I nogle abiotiske kontroller er der et indledende fald i koncentration af pesticidnedbrydningsprodukterne, hvilket indikerer, at stofferne adsorberer til det tilsatte filtermateriale. Adsorptionen er generelt større for DPC end for DMS.
- Et generelt fald i koncentrationerne i abiotiske kontroller over tid betyder, at forsøgene ikke entydigt kan påvise, at den observerede fjernelse i biologisk aktive prøver skyldes en biologisk proces.

4. Optimering af nedbrydningspotentialer

Resultaterne fra screening af nedbrydningspotentialer på de 10 forskellige vandværker dannede grundlag for en videre undersøgelse af mulighederne for at optimere potentialer. Optimering af nedbrydningspotentialer blev undersøgt for følgende parametre:

1. Tilsætning af metan
2. Effekt af substrat-forhold og doseringsstrategi
3. Effekt af kobber-koncentration og MMO udtrykt i MOB
4. MOB kultur og substrat-forhold

Der blev udført batchforsøg efter samme eksperimentelle principper som i screeningen, hvor biologisk materiale i form af filtersand eller bakterie-biomasse og vand med indhold af pesticidnedbrydningsprodukter blandes i lukkede flasker. I optimeringsforsøgene blev batchforsøgene endvidere tilsat forskellige koncentrationer af hhv. metan, pesticidnedbrydningsprodukt og kobber. Derudover blev der udført forsøg med forskudt tilsætning af substrater for at teste en mulig effekt af doseringsstrategi. De konkrete forsøgsopstillinger er beskrevet i det efterfølgende afsnit.

4.1 Metodebeskrivelse for optimering af nedbrydningspotentialer

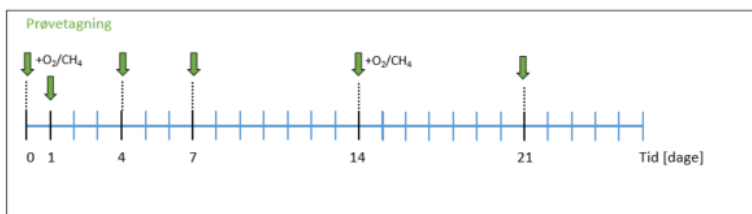
Forsøgsbeskrivelse: Forsøgsopstillingerne med filtersand er designet som batchforsøg i 300 ml serumflasker lukket med teflon-coatede gummipropper og metal skrueåb. Her blandes 100 g filtersand med 100 ml vand udtaget ved afgang vandværk. Der opstilles et passende antal flasker til at teste en række forskellige kombinationer af substrattilsætning. Derudover inkluderes flasker til abiotiske kontroller hhv. en abiotisk kontrol med filtersand tilsat 3,6 ml $ZnCl_2$ og en kontrol kun med vand, uden tilsat filtersand. Sand, vand, metan og ilt tilsættes først flaskerne, og forsøget startes ved tilsætning af pesticidstof hhv. DMS, DPC og Bentazon. Flaskerne opbevares på rystebord ved 10°C. Forsøgsopstillingerne er beskrevet i efterfølgende afsnit (Tabel 8, Tabel 9 og Tabel 10 samt Figur 18, Figur 19 og Figur 20).

Forsøgene med MOB-kulturen er designet som lukkede batchforsøg i 250 ml serumflasker forsejlet med teflon-coatede gummipropper og metal klemmer. Den anvendte bakterie-biomasse er en blandet MOB kultur oprindeligt opdyrket fra spildevand i et syntetisk vækstmedie med ammonium som nitrogenkilde (Dedysh & Dunfield, 2017 & Whittenbury et al., 1970). MOB kulturen er dyrket på DTU Miljø, hvor den tidligere er karakteriseret via biologiske analyser i forhold til sammensætning og beskrivelse af MOB stammer (Tsapekos et al., 2020). De indledende forsøg med MOB kulturen er udført med 10 volumen % MOB biomasse i drikkevand afgang værk. De øvrige forsøg med MOB kulturen er udført med 3 vol. % MOB-biomasse i vækstmedie i stedet for drikkevand, for at sikre en tilstrækkelig stimulering af MOB aktivitet ved tilstedeværelse af næringsalte og spormetaller inkl. kobber. Biomasse, vand, metan og ilt tilsættes først flaskerne, og forsøget startes ved tilsætning af pesticidstoffer hhv. DMS, DPC og Bentazon. Flaskerne opbevares under omrøring ved 10°C. Forsøgsopstillingerne er beskrevet i afsnit herunder (Tabel 11, Tabel 12, Figur 21 og Figur 22).

Forsøgsopstilling til test af tilsætning af metan:

Tabel 8: Opstilling af optimeringsforsøg til test af effekten af metan-tilsætning på nedbrydningspotentiale for DMS og DPC på Sjælsø anlæg II.

Nr.	ID	Vand	Filtersand	DPC	DMS	Bentazon	CH ₄	O ₂
		[ml]	[g]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[% v/v]	[% v/v]
1	F-1	100	100	2	2	2	10	20
2	F-2	100	100	2	2	2	10	20
3	F-3	100	100	2	2	2	20	40
4	F-4	100	100	2	2	2	20	40
5	FA-1	100	100	2	2	2	10	20
6	FA-2	100	100	2	2	2	10	20
7	VK-1	100	-	2	2	2	10	20
8	VK-2	100	-	2	2	2	10	20

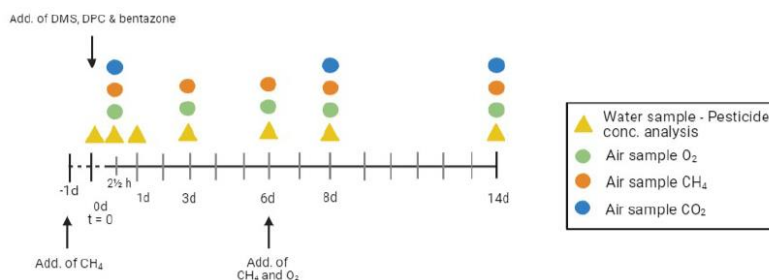


Figur 18: Prøvetagningsstrategi for batchforsøg for optimering af nedbrydningspotentialet for DMS/DPC på Sjælsø anlæg II.

Forsøgsopstilling til test af substrat-forhold:

Tabel 9: Opstilling af optimeringsforsøg til test af effekten af substrat-forhold på det biologiske potentiale for nedbrydning af DMS og DPC (Hummelshøj, 2021).

Nr.	ID	Vand	Filtersand	Aktivitet	DMS	DPC	Bentazon	CH ₄	ZnCl ₂
		[mL]	[g]		[ug/L]	[ug/L]	[ug/L]	[mg/L]	[mL]
1	FM_0,5	100	100	Biologisk	0,5	0,5	0,5	1,5	-
2	FM_5	100	100	Biologisk	5	5	5	1,5	-
3	FM_50	100	100	Biologisk	50	50	50	1,5	-
4	FM_500	100	100	Biologisk	500	500	500	1,5	-
5	FU_5	100	100	Biologisk	5	5	5	1,5	-
6	FU_50	100	100	Biologisk	50	50	50	1,5	-
7	FA_5	100	100	Abiotisk	5	5	5	1,5	3,6
8	VK_5	180	-	Abiotisk	5	5	5	1,5	-

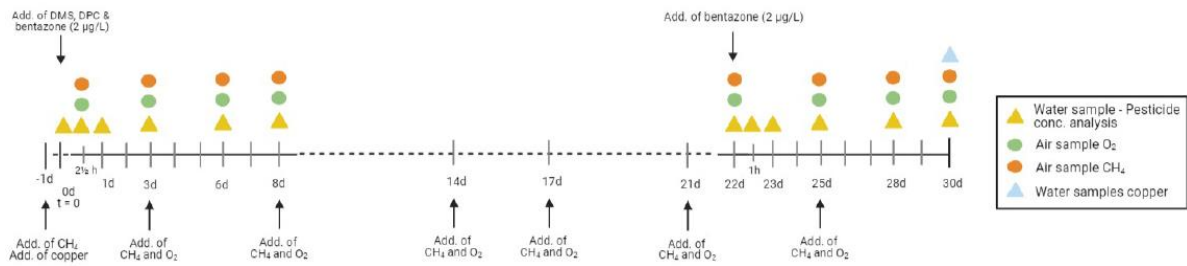


Figur 19: Prøvetagningsstrategi for batchforsøg til test af effekten af substratforhold på nedbrydningspotentialet for DMS og DPC (Hummelshøj, 2021).

Forsøgsopstilling til test af tilsætning af kobber:

Tabel 10: Opstilling af optimeringsforsøg til test af effekten af kobbertilsætning på det biologiske potentiale for nedbrydning af DMS og DPC (Hummelshøj, 2021).

Nr.	ID	Vand [mL]	Filtersand [g]	Aktivitet	DMS, DPC og		ZnCl ₂ [mL]	ATU [mg/L]	Cu [µg/L]
					Bentazon [µg/L]	CH ₄ [mg/L]			
1	FM	100	100	Biologisk	2	1,5	-	-	-
2	FM_ATU	100	100	Biologisk	2	1,5	-	1,7	-
3	FM_1	100	100	Biologisk	2	1,5	-	-	1
4	FM_10	100	100	Biologisk	2	1,5	-	-	10
5	FM_100	100	100	Biologisk	2	1,5	-	-	100
6	FM_1000	100	100	Biologisk	2	1,5	-	-	1000
7	FA_100	100	100	Abiotisk	2	1,5	3,6	-	100
8	VK_100	180	-	Abiotisk	2	1,5	-	-	100

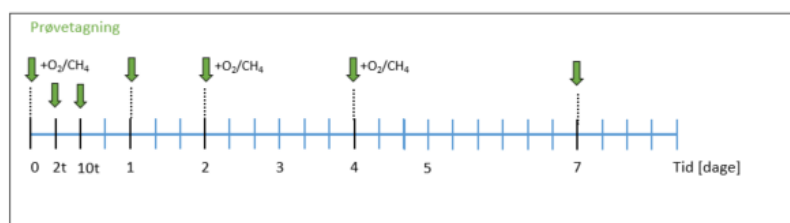


Figur 20: Prøvetagningsstrategi for batchforsøg til test af effekten af substratforhold på nedbrydningspotentialet for DMS og DPC (Hummelshøj, 2021).

Forsøgsopstilling til indledende test af MOB kultur:

Tabel 11: Opstilling for indledende test med MOB-kultur for undersøgelse af co-metabolisk nedbrydning af DMS og DPC.

Nr.	ID	Vand [ml]	Biomasse [ml]	DPC [µg/L]	DMS [µg/L]	Bentazon [µg/L]	CH ₄ [mg/L]
2	B-M_h	45	5	2	2	2	10
3	B-M_l	45	5	2	-	-	1
4	B-M_l	45	5	2	2	2	1
5	BA	45	5	2			5
6	BA	45	5	2	2	2	5
7	VK	50	-	2	-	-	5
8	VK	50	-	2	2	2	5

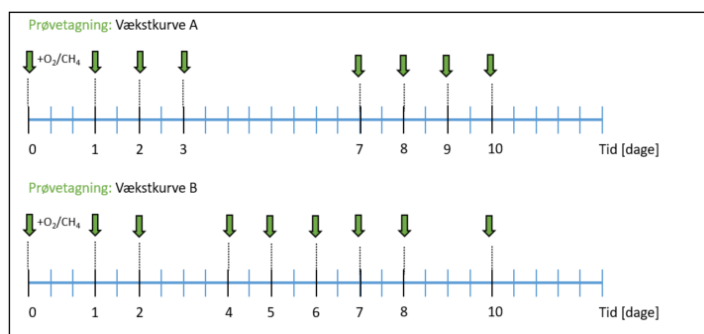


Figur 21: Prøvetagningsstrategi for batchforsøg til indledende test af MOB kultur ift. nedbrydningspotentialet for DMS og DPC.

Forsøgsopstilling til test af MOB kultur og substrat-forhold:

Tablet 12: Opstilling for indledende test med MOB-kultur for undersøgelse af co-metabolisk nedbrydning af DMS og DPC.

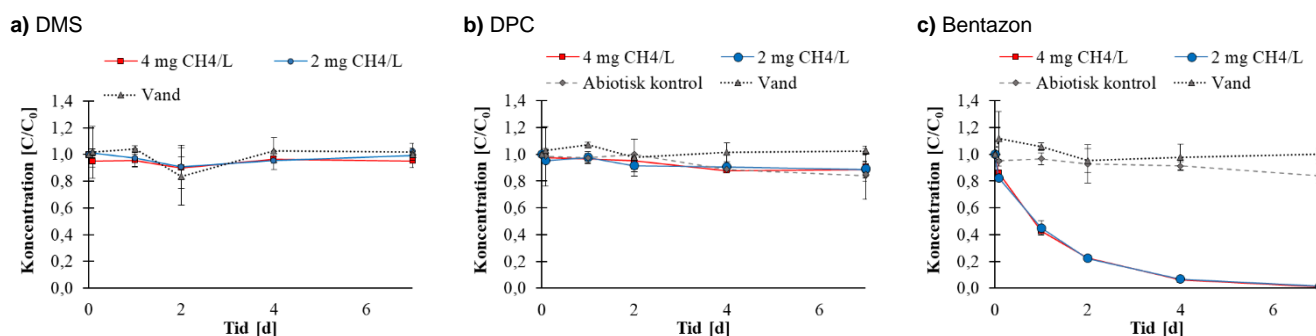
Nr.	ID	Vand [ml]	Biomasse [ml]	DPC, DMS og Bentazon [µg/L]	O ₂ :CH ₄ [vol/vol]
1	Blank	100	-	500	60:40
2	Kontrol	97	3	0	60:40
3	P1	97	3	0,5	60:40
4	P2	97	3	5	60:40
5	P3	97	3	50	60:40
6	P4	97	3	500	60:40



Figur 22: Prøvetagningsstrategi for batchforsøg til test af MOB kultur og substrat-forhold ift. nedbrydningspotentialet for DMS og DPC.

4.1 Tilsætning af metan

Nedbrydningsforsøg med filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) viste ikke det tidligere observerede potentiale for at fjerne DPC og DMS inden for 7 dage (Figur 23). Forsøgene indikerede en generelt højere adsorption af DPC til filtermaterialet end adsorption af DMS. Nedbrydningsforsøgene viste samtidig et tydeligt potentiale for at fjerne bentazon, som er fuldt nedbrudt efter 7 dages kontakt med filtersand fra Sjælsø. Der blev imidlertid ikke fundet en effekt af tilsætning af metan til batchforsøgene (Tabel 13).



Figur 23: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) med forskellig dosering af metan hhv. 2 mg CH₄/L og 4 mg CH₄/L. Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

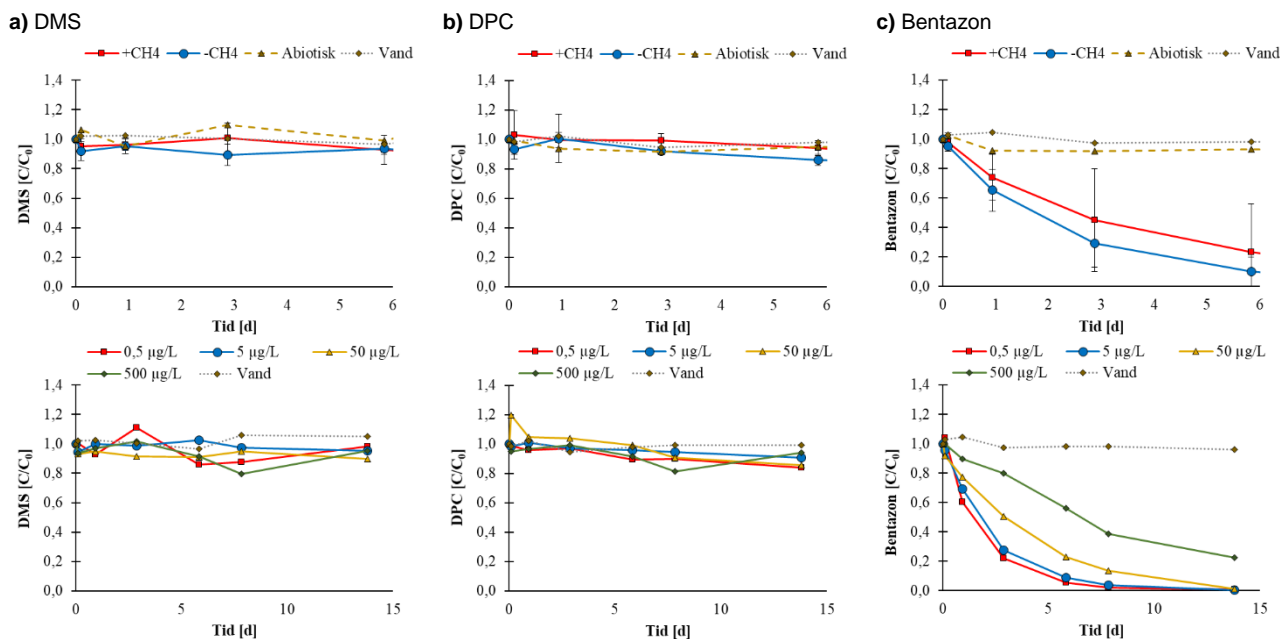
Tabel 13: Fjernelse* af DPC, DMS og Bentazon i batch-forsøg med vand og filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) og tilsætning af CH₄ data efter 7 dages inkubation med 2 µg/l.

	+CH ₄ (2 mg/L)	+CH ₄ (4 mg/L)
DMS	0 ± 1 %	5 ± 5 %
DPC	11 ± 6 %	11 ± 2 %
Bentazon	99 ± 1 %	99 ± 1 %

*Baseret på nul fjernelse i abiotiske kontroller

4.2 Effekt af substrat-forhold

Tilsætning af metan viste ikke en umiddelbar effekt på fjernelse af DPC, DMS eller bentazon (Figur 24). Forsøg med ændret substrat-forhold, dvs. forhold mellem tilsætning primært substrat (metan) og sekundært substrat (pesticidnedbrydningsprodukt) havde ikke en effekt på fjernelsen af DPC eller DMS (Tabel 14). For bentazon var der større fjernelse relativt til startkoncentrationen ved lavere koncentrationer af pesticid ved samme metantilsætning (Figur 24).



Figur 24: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon (C₀ = 2 µg/l) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) med samme dosering af metan 2 mg CH₄/L og varierende dosering af pesticider hhv. 0,5 5, 50 og 500 µg/L (Hummelshøj, 2021).

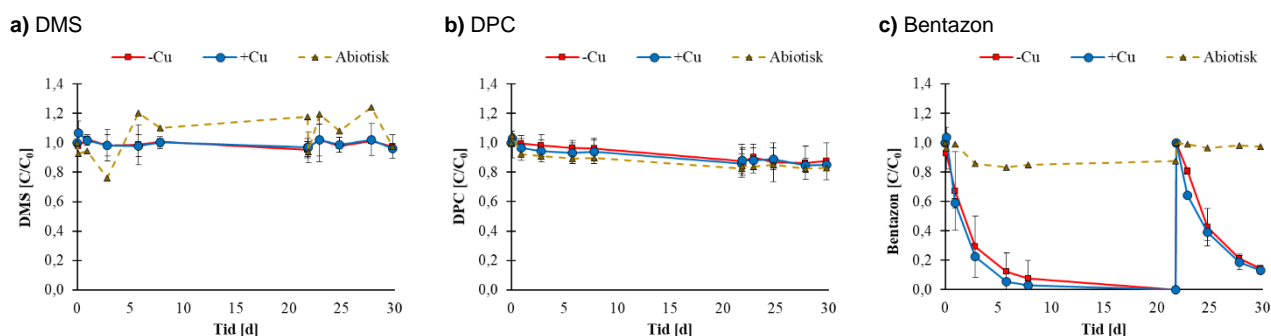
Tabel 14: Fjernelse* af DPC, DMS og bentazon i batch-forsøg med vand og filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II), data efter 14 dages inkubation med varierende substratforhold og 2 mg/L CH₄ (Hummelshøj, 2021).

	0,5 µg/L	5 µg/L	50 µg/L	500 µg/L
DMS	2 %	5 %	10 %	5 %
DPC	16 %	9 %	15 %	6 %
Bentazon	99 %	100 %	99%	88 %

*Baseret på nul fjernelse i abiotiske kontroller

4.3 Kobber koncentration og MMO udtrykt i MOB

Forsøg med varierende koncentration af kobber viste ikke effekt på fjernelsen af DPC eller DMS, da koncentrationen generelt er stabil over forsøgsperioden på 30 dage (Figur 25 og Tabel 15). Den gennemsnitlige fjernelse af bentazon er større i batchforsøgene ved tilsætning af kobber, men denne effekt er ikke større end analyse- og metodeusikkerheden (Figur 25).



Figur 25: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) med og uden tilsætning af kobber (Hummelshøj, 2021).

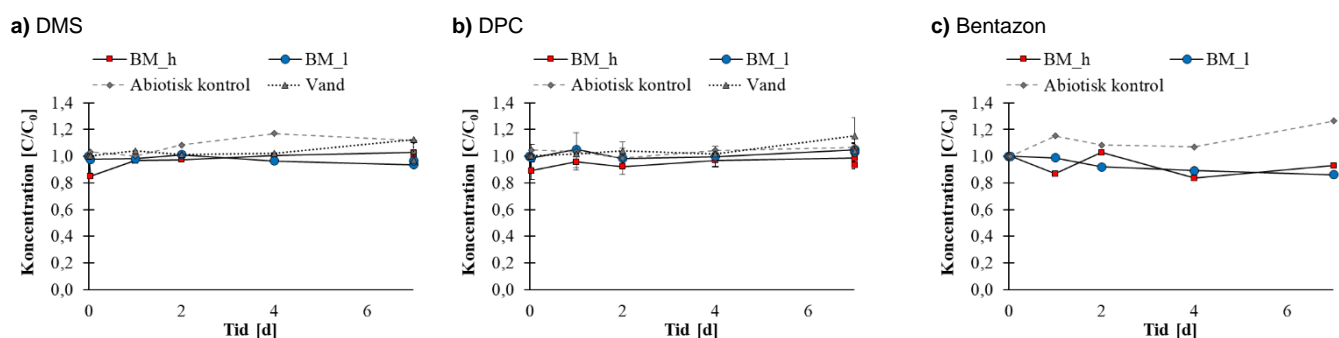
Tabel 15: Fjernelse* af DPC, DMS og bentazon i batch-forsøg med vand og filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II), data efter 30 dages inkubation med varierende tilsætning af kobber og 2 mg/L CH₄ (Hummelshøj, 2021).

	+ATU	Gens. - Cu	1 µg/L	10 µg/L	100 µg/L	1000 µg/L	Gens. + Cu
n =	1	2	1	1	1	1	4
DMS	7 %	3 ± 8 %	8 %	5 %	3 %	4 %	4 ± 1 %
DPC	6 %	13 ± 13 %	21 %	18 %	13 %	17 %	15 ± 4 %
Bentazon**	86 %	85 ± 1 %	87 %	83 %	88 %	86 %	87 ± 2 %

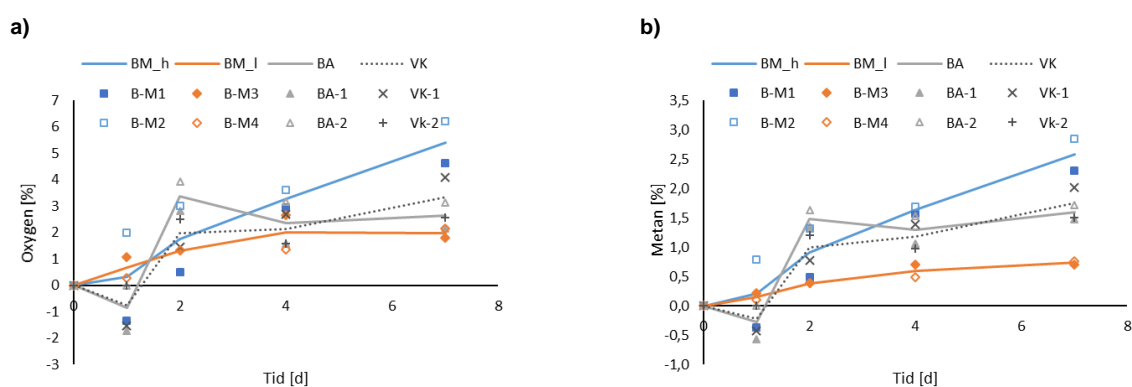
*Baseret på nul fjernelse i abiotiske kontroller, **Efter anden tilsætning af bentazon 2 µg/L.

4.4 MOB kultur og substrat-forhold

De indledende undersøgelser med MOB kulturen viste ikke potentiale for nedbrydning af hverken DPC, DMS eller bentazon gennem forsøgsperioden på 7 dage (Figur 26). Der blev generelt set observeret et lavt forbrug af ilt og metan sammenlignet med forbruget i screeningsforsøg med filtersand (Figur 27). Dette kan indikere, at MOB kulturen har været begrænset af fx mangel på næringssalte eller spormetaller, som ikke har været tilstede i drikkevand afgang værk, der blev anvendt i nedbrydningsforsøgene. Derfor blev der ændret i forsøgsopstillingen i de videre undersøgelser af MOB kulturen ift. vurdering af nedbrydningspotentialet for DPC og DMS baseret på metanoxidation. MOB kulturen gennemgik en adaptationsperiode på 3 uger, hvori den blev kultiveret i syntetisk vækstmedie under omrøring ved 10 °C. Herefter blev MOB kulturen anvendt til de øvrige nedbrydningsforsøg.

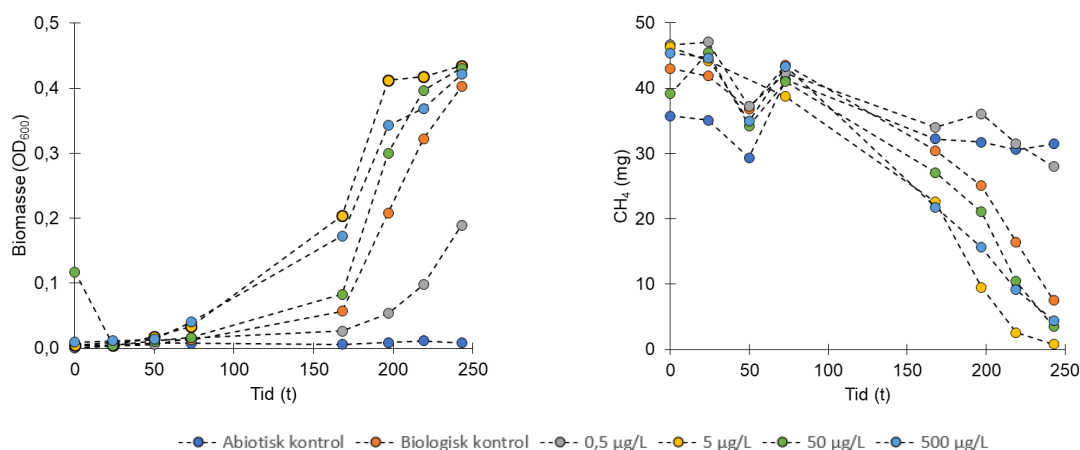


Figur 26: Koncentration af DMS, DPC og Bentazon i nedbrydningsforsøg med MOB-kultur fra DTU Miljø.



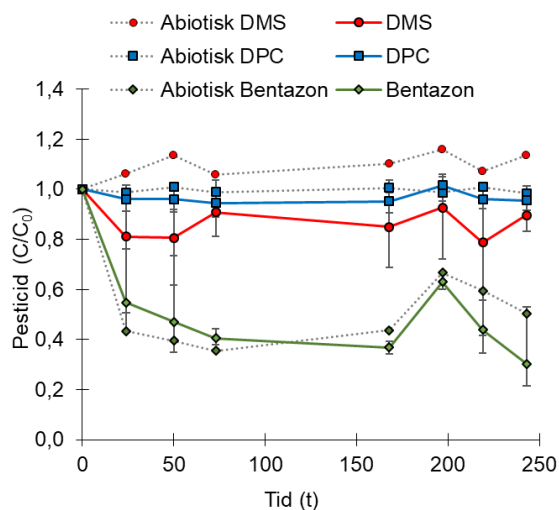
Figur 27: Akkumuleret v/v% forbrug af oxygen og metan i gasfasen i indledende test af MOB-kultur fra DTU Miljø.

I de efterfølgende undersøgelser af MOB-kulturen, blev der opstillet et fed-batch forsøg med tilsætning af ilt og metan over to gange. Her blev væksten af MOB monitoreret, estimeret ved optisk densitet (OD), som supplement til måling af ilt- og metanforbruget i batchforsøgene. OD steg over tid, hvilket indikerer, at MOB kulturen voksede som resultat af gode vækstbetingelser (Figur 28). Samtidig faldt metankoncentrationen i batchforsøgene over tid, som resultat af at MOB-kulturens vækst. Batchforsøgene indikerede en lag-fase på ca. 3 dage. Efter 10 dage havde alle batchforsøg opnået maksimale vækst (OD), undtagen P1 med laveste koncentration af pesticidnedbrydningsprodukt tilsat. Forbruget af metan var ligeledes lavere i denne batch. Resultaterne indikerede endvidere, at MOB-kulturen ikke blev påvirket negativt eller begrænset af tilstedeværelsen af pesticidnedbrydningsprodukt, da den biologiske kontrol (uden tilsat pesticidnedbrydningsprodukt) også viste en øget OD og et metanforbrug.



Figur 28: Observeret vækst af MOB kultur estimeret ved hhv. a) optisk densitet og b) metan i batchforsøg med MOB-kultur fra DTU Miljø.

Der blev generelt ikke observeret fjernelse af DPC og DMS i batchforsøg med MOB-kulturen (Figur 29). Der var en relativt lavere koncentrationer af DMS i de biologisk aktive batchforsøg, men koncentrationen af DMS faldt ikke over forsøgsperioden på de 10 dage i disse prøver, hvilket derfor indikerer en overestimeret startkoncentration. I modsætning til DPC og DMS faldt koncentrationen af bentazon over tid, hvilket tyder på en nedbrydning af stoffet (Figur 29). Faldet sker i to faser hhv. i lag-fasen inden MOB vækst er observeret jf. OD og metanforbrug, og igen ved den stationære fase, når metanen er opbrugt og maksimalt OD er opnået. Der var dog samtidig et fald i abiotiske prøver uden tilsætning af MOB-kulturen, hvorfor forsøgene ikke entydigt kan påvise, at fjernelsen skyldes en co-metabolisk nedbrydning baseret på metanoxidation.



Figur 29: Relativ koncentration af DPC, DMS og Bentazon i test af MOB-kultur fra DTU Miljø.

4.5 Opsamling af resultater fra optimering af nedbrydningspotentialet

Overordnet set viste resultaterne ikke nogen målbar effekt af de undersøgte optimeringsparametre i forhold til potentialet for biologisk nedbrydning af DPC og DMS i filtersand og med MOB-kultur (Tabel 16).

Tabel 16: Oversigt over resultater fra undersøgelser af optimering af mikrobiologisk nedbrydning af DPC, DMS og bentazon.

Parameter	Fjernelse af pesticidstof			Optimering	Testforhold	
	[1 - C/C ₀]					
	DPC	DMS	Bentazon			
Filtersand Sjælsø vandværk anlæg II	Metan	0,11	0,01	0,99	Ingen effekt af tilsat metan (2-4 mg CH ₄ /L).	Startkoncentration på 2 µg/l, fjernelse over 7 dages inkubation med tilsætning af CH ₄ (2-4 mg/L).
		±2,2%	±2,9%	±0,2%		
	Substratforhold	0,15	0,10	0,99	Ingen effekt af tilsat metan (5 mg CH ₄ /L).	Startkoncentration på 2 µg/l, fjernelse over 16 dages inkubation med 5 mg CH ₄ /L
		±2,5%	±3,3%	±0,0%		
	Kobber	0,16	0,02	0,97	Ingen effekt af substratforhold (3:1 – 3000:1).	Startkoncentration på 0,5 µg/l, fjernelse over 14 dages inkubation med tilsætning af 2 mg/L CH ₄ .
		0,10	0,02	0,97		
MOB kultur DTU Miljø	Metan	0,04	0,02	0,10	Ingen effekt af tilsat metan.	Startkoncentration på 2 µg/l, fjernelse over 7 dages inkubation med 10 ml MOB-biomasse og 5 mg CH ₄ /L. Vand afgang vandværk.
		±3,3%	±3,2%	±3,4%		
	Substratforhold	0,08	0,10	0,70	Ingen effekt af substratforhold.	Startkoncentrationer varierende fra 0,5-500 µg/l, fjernelse over 10 dages inkubation med 3 vol.% MOB-biomasse og 40:60 ratio CH ₄ :O ₂ tilsætning i gasfasen. MOB vækstmedie.

Resultaterne fra optimeringen viste ingen målbar effekt af tilsætning af metan på potentialet for fjernelse af DPC eller DMS i filtersand. Optimeringen viste samtidig, at potentialet for nedbrydning af bentazon kan være påvirket af tilstedeværelsen af metan. Her viste batchforsøgene, at den relative fjernelse af bentazon var mindre ved tilsætning af metan. Dette kan indikere, at nedbrydningen af bentazon i sandfiltre er optimalt under en bestemt doseringsstrategi nemlig ved udsultning af de tilstedeværende MOB bakterier. Forsøg med MOB kulturen viste i den forbindelse, at fjernelsen af bentazon var lavest under vækstoffasen, hvor metanforbruget er højest, og den optiske densitet (OD) stiger mest.

Resultaterne fra optimeringen viste ingen effekt af et ændret forhold mellem primært substrat (metan) og sekundært substrat (pesticidstof) på nedbrydningspotentialet for DPC og DMS. For bentazon derimod var den relative fjernelse i batchforsøgene større ved et højere substrat-forhold, dvs. når koncentrationen af pesticidnedbrydningsprodukt var lavest i forhold til koncentrationen af metan. Resultaterne viste en fuldstændig fjernelse af 0,5 µg/l bentazon efter 8 dages kontakt med filtersand. Efter samme kontakttid blev 60 % fjernet af en koncentration på 500 µg/l bentazon. Således er den egentlige fjernelsesrate ud fra et masseperspektiv større ved en højere belastning med pesticidnedbrydningsprodukt. Ved det laveste substrat-forhold (3:1) fjernes der ca. 30 µg bentazon sammenlignet med at der ved det højeste substrat-forhold (3000:1) fjernes ca. 0,05 µg bentazon.

Batchforsøg med varierende koncentration af kobber viste ingen målbar effekt på fjernelsen af DPC, DMS eller bentazon i filtersand. Der var hverken effekt af forhøjede koncentrationer af kobber (1-1000 µg Cu²⁺/l tilsat) eller reduktion af samme (ved tilsætning af ATU som chelator). Forbruget af metan blev heller ikke påvirket af de ændrede kobberkoncentrationer i batchforsøgene. Dette indikerer, at aktiviteten og de co-metaboliske egenskaber af MOB tilstede i filtersand ikke bliver påvirket af de anvendte koncentrationer af kobber. Det kan enten skyldes, at typen af MOB ikke tillader en ændring i MMO enzymet, dvs. at de ikke koder for sMMO, og dermed det mere uspecifikke enzym, eller at indgrebene i batchforsøgene ikke i tilstrækkeligt omfang har forårsaget en ændring i den tilgængelige kobberkoncentration.

Batchforsøgene med MOB-kulturen viste ikke potentiale for nedbrydning af DPC eller DMS. Samtidig viste forsøgene heller ingen effekt af metantilsætning eller ændret substrat-forhold på potentialet for fjernelse af DPC og DMS. MOB-kulturen indikerede et potentiale for nedbrydning af bentazon. Med en fjernelse på 70 % efter 10 dages kontakt med MOB kulturen (3 vol. %). Dog blev der ikke observeret nogen effekt af ændret substrat-forhold på fjernelsen af bentazon, og abiotiske kontroller kunne ikke entydigt bekræfte, at fjernelsen skyldes en biologisk nedbrydning.

4.6 Konklusioner fra optimering af nedbrydningspotentialet

Laboratorieundersøgelserne af optimering af nedbrydningspotentialet har bidraget til følgende konklusioner:

- Ved tilsætning af metan til batchforsøg øges forbruget af både metan og ilt, hvilket indikerer, en stimulering af aktiviteten af MOB, der er tilstede i sandfiltrene.
- Øget tilsætning af metan (2 til 10 mg CH₄/L koncentration i vandfasen) til batchforsøg med i materiale fra sandfiltre øger ikke fjernelsen af DPC eller DMS.
- Forsøg med en MOB kultur viste ikke potentiale for at fjerne DPC eller DMS, og der er ikke observeret en effekt ved tilsætning af metan.
- Der er ikke nogen effekt af forholdet mellem primært substrat (metan) og sekundært substrat (pesticidnedbrydningsprodukt, DPC eller DMS), da et ændret substrat-forhold (3:1 til 3000:1) ikke påvirker fjernelsen af DPC eller DMS hverken i sandfiltre eller i MOB kultur.
- Kobberkoncentrationen (1 til 1000 µg Cu²⁺/L) havde ingen effekt af på fjernelsen af DPC eller DMS i filtersand. Der var ligeledes ingen effekt af at fjerne kobber ved tilsætning af chelator.
- Der er ikke observeret nogen effekt af ændret doseringsstrategi på fjernelsen af DPC eller DMS i filtersand, dvs. der er fx ikke nogen effekt af at udsulte filtersandet for metan før tilsætning af pesticidnedbrydningsprodukt, og forsøg med MOB-kulturen viste ingen kobling mellem fjernelse af DPC eller DMS og en bestemt vækstfase.
- Batchforsøg med bentazon viste fuldstændig fjernelse efter 7 dages kontakt med filtersand, og har dermed fungeret som en positiv kontrol af metode- og forsøgsdesign.
- Batchforsøg med bentazon har samtidig vist, at nedbrydningen kan være koblet til metanoxidation, da 1) fjernelsen i filtersand overordnet har været størst under tilsætning af metan jf. resultaterne fra screeningen, og 2) doseringsstrategien for metan og pesticid har påvirket fjernelsen af bentazon jf. resultaterne fra forsøg med MOB-kulturen.

5. Skalérbarhed og konceptuelt design af renseteknologi

5.1 Metodebeskrivelse for overførsel af potentiale

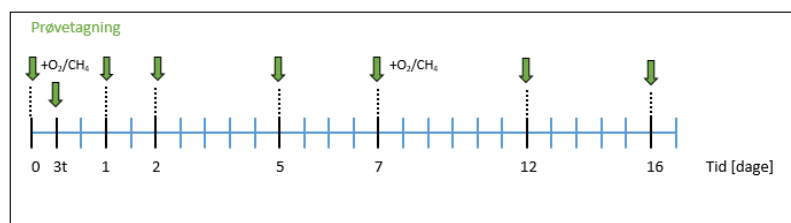
Formål: At undersøge hvorvidt et potentiale for biologisk nedbrydning af DPC eller DMS kan overføres til Staurbyskov Vandværk fra hhv. en MOB-kultur og filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II).

Princip: Princippet bag forsøgene er at berige filtersand fra Staurbyskov Vandværk med biologisk aktivt materiale fra hhv. en MOB-kultur og filtersand fra et andet vandværk for at overføre og optimere potentialet for at fjerne DPC og DMS på Staurbyskov Vandværk.

Forsøgsbeskrivelse: Opstillingen designes som batchforsøg i 300 ml serumflasker lukket med teflon-coatede gummipropper og metal skruelåg. Forsøget opstilles i 10 flasker (Tabel 17). Der opstilles flasker til at beskrive nedbrydningspotentialet separat i filtersand fra Staurbyskov Vandværk, flasker, hvor filtersand fra Staurbyskov beriges med sand fra Sjælsø (50:50 g), og flasker hvor filtersand fra Staurbyskov beriges med MOB-kulturen (3 ml MOB til 100 g sand). Derudover opstilles der to flasker som abiotiske kontroller hhv. en abiotisk kontrol med filtersand tilsat 3,6 ml ZnCl₂ og en kontrol kun med vand, uden tilsat filtersand. Sand, vand, bakteriekultur samt metan og ilt tilsættes flaskerne. Forsøget startes ved tilsætning af 2 µg/L pesticidstof hhv. DMS, DPC og Bentazon. Flaskerne opbevares under omrøring ved 10°C og prøvetages med stabil frekvens over en forsøgsperiode på 16 dage (Figur 30).

Tabel 17: Opstilling af batchforsøg for test af overførsel af biologisk nedbrydningspotentiale for DMS og DPC.

Nr.	ID	Vand [mL]	Filtersand [g]	MOB [mL]	Aktivitet	DMS [ug/L]	DPC [ug/L]	Bentazon [ug/L]	CH ₄ [mg/L]
1-2	ST_M	100	100	-	Biologisk	2	2	2	5
3-4	SJ_M	100	100	-	Biologisk	2	2	2	5
5-6	ST+SJ_M	100	50 + 50	-	Biologisk	2	2	2	5
7-8	ST+MOB_M	100	100	3	Biologisk	2	2	2	5
9	ST_Z	100	100	-	Abiotisk	2	2	2	-
10	VK	100	-	-	-	2	2	2	-

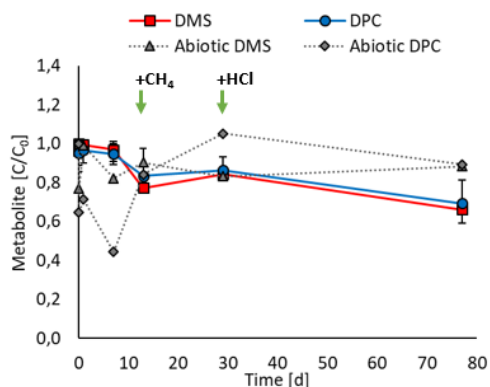


Figur 30: Prøvetagningsstrategi for batchforsøg til test af overførsel af nedbrydningspotentiale for DMS og DPC ved berigelse af filtersand fra Staurbyskov Vandværk.

5.1 Overførsel af potentiale

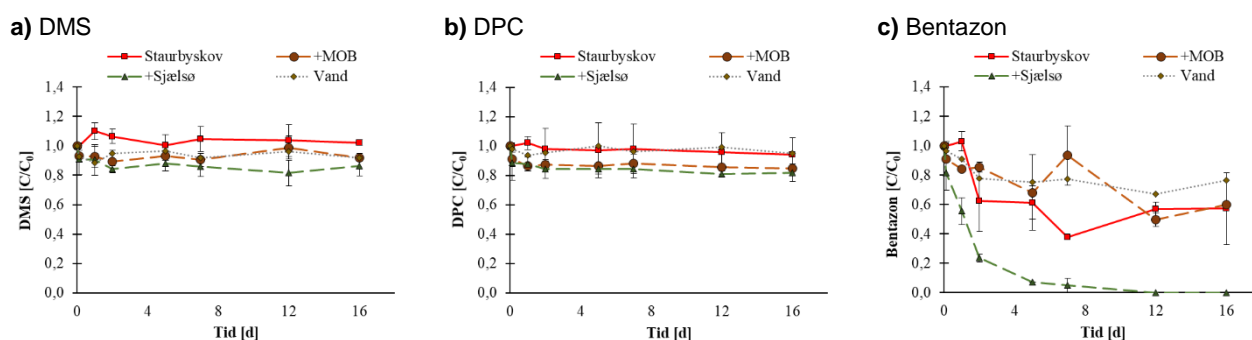
Der er indledningsvist udført forsøg, hvor filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II), som har vist det største potentiale for nedbrydning af DPC og DMS, er anvendt til at behandle vand fra Staurbyskov Vandværk med et naturligt forekommende indhold af pesticidnedbrydningsprodukter (hhv. 0,9 µg/l DPC og 0,2 µg/l DMS). Resultaterne indikerede, at der var et potentiale i filtersand fra Sjælsø til at fjerne DPC og DMS fra vand fra Staurbyskov (Figur 31). Der blev observeret en fjernelse af DPC på 17 ±10 % og DMS på 23 ±2 % efter 14 dages kontakt med filtersandet. Potentialet er dermed relativt

lavere, end hvad der blev observeret med vand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) tilført pesticidnedbrydningsprodukter (2,5 µg/l). Dette kan indikere, at potentialet for nedbrydning er begrænset af vandets øvrige kemiske sammensætning, som er forskelligt fra den type, som filtersandet er vant til at behandle.



Figur 31: Fjernelse af DMS og DPC i batch-forsøg af 100 ml vand fra Staurbyskov vandværk og 100 g filtersand fra Sjælsø Vandværk. Errorbar er afvigelse mellem triplikater.

Batchforsøg med filtersand fra Staurbyskov Vandværk alene har ikke indikeret et potentiale for at fjerne DPC og DMS, da der er observeret stabile koncentrationer over forsøgsperioden på 16 dage (Figur 32). Ved tilsætning af MOB-kultur eller filtersand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) var der en mindre optimering i fjernelsen af DMS og DPC (Tabel 18). Her steg fjernelsen af DPC fra 6 % til 15 % ved berigelse med MOB-kulturen og fra 6 % til 18 % ved berigelse med filtersand fra Sjælsø.



Figur 32: Fjernelse af DMS, DPC og Bentazon ($C_0 = 2 \mu\text{g/l}$) i batch-forsøg med filtersand og vand (100g/100 ml vand) fra Staurbyskov Vandværk samt stimulering ved tilsætning af MOB kultur eller sand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) og under dosering af metan 5 mg CH_4/L . Errorbar er afvigelse mellem duplikater.

Tabel 18: Fjernelse* af DPC, DMS og bentazon i batch-forsøg med vand og filtersand fra Staurbyskov Vandværk ved forskellig bioargumentation hhv. tilsætning af MOB kultur og sand fra Sjælsø Vandværk (anlæg II) data efter 16 dages inkubation med 2 µg/l pesticid og 2 mg/L CH_4 .

	Staurbyskov	+ MOB	+ Sjælsø
DMS	0 %	8 %	14 %
DPC	6 %	15 %	18 %
Bentazon	43 %	50 %	99 %

*Baseret på nul fjernelse i abiotiske kontroller

5.2 Vurdering af skalérbarhed

Foruden forsøg med overførsel af nedbrydningspotentialet er skalérbarheden af processen vurderet. Dette er gjort med afsæt i resultaterne fra både screeningen og optimeringen, hvor et observeret potentiale i batchforsøgene er blevet omregnet til et forventeligt potentiale i fuldskala vandbehandling under en række antagelser. Der er bl.a. gjort antagelser om dimensionering af et traditionelt sandfilter samt driften heraf ift. opholdstid og relevant belastning af råvand forurenet med pesticidnedbrydningsprodukt (Tabel 19).

Tabel 19: Antagelser anvendt til vurdering af skalérbarhed ift. implementering af en renseteknologi baseret på mikrobiologisk nedbrydning af DPC og DMS.

Filter karakterisering	
Dybde [m]	0,8
Bulk densitet [t/m^3]	1,6
Porevolumen	0,33
Driftsforhold	
Opholdstid [min]	20
Pesticidkoncentration [$\mu g/l$]	0,1

I screeningsforsøgene blev fjernelsen af DPC og DMS estimeret til hhv. 23 % og 35 % efter 7 dages kontakt med filtersand (startkoncentration på $2,5 \mu g/L$). Dette svarer til en massefjernelse på ca. $0,1 \text{ ng/g sand/dag}$. Batchforsøgene er udført over en længere tidsperiode end den reelle opholdstid i et sandfilter, men forholdet mellem vand og sand vil være lavere i et sandfilter sammenlignet med batchforsøgene. Antages det for et traditionelt sandfilter at filteret har en densitet på $1,6 t/m^3$, en dybde på $0,8 \text{ m}$ og en porevolumen på $0,33$, samt en opholdstid på 20 min . Og sammenlignes dette med en belastning af pesticidnedbrydningsprodukt, der kan tilgå filteret med en indløbskoncentration på $0,1 \mu g/L$, vil reduktionen svare til en udløbskoncentration på $0,099 \mu g/L$. En forurening med DPC eller DMS vil således være nedsat med $0,05 \%$ ift. indløbskoncentrationen. Den observerede fjernelse i screeningen er således næppe tilstrækkeligt hurtig til at være relevant for drikkevandsbehandling på nuværende tidspunkt.

Sammenligner man ovenstående med det observerede nedbrydningspotentiale for bentazon, som i batchforsøg er helt fjernet efter 7 dage, vil den tilsvarende fjernelse i et standard sandfilter svare til en reduktion i forureningen på 20% . Selvom der er visse lighedspunkter mellem den kemiske struktur af DPC og bentazon, har stofferne også væsentlige forskelle, fx har bentazon en intakt benzen-ring og DPC har et chlor-atom. DMS har imidlertid ikke de samme strukturelle lighedspunkter. DMS er et betydeligt mindre stof, og det er tilmed ladet ved neutral pH. Forskelle i stoffernes fysisk-kemiske egenskaber vil sandsynligvis påvirke deres mikrobiologiske nedbrydelighed, og det er derfor sandsynligvis ikke de samme mekanismer og/eller processer, der initierer nedbrydningen. Resultaterne i dette projekt indikerer, at nedbrydningen af bentazon hænger sammen med til metanoxidation, men den samme kobling blev ikke observeret for DPC og DMS.

Da laboratorieforsøg i screeningen og optimeringen af nedbrydningspotentialet ikke har vist tilstrækkeligt stort potentiale for nedbrydning af DPC og DMS, er der ikke udviklet et konceptuelt design af en egentlig renseteknologi. Forsøgene har vist en mindre stimulering af nedbrydningspotentialet ved be-rigelse af eksisterende filtersand. Det vil imidlertid være begrænset, hvor meget et sandfilter kan øge densiteten af biomassen under dets relevante driftsforhold så som flowhastighed og returskyl i forhold til filterets øvrige funktion i vandbehandlingen. Såfremt der skal optimeres yderligere på densiteten af

biomassen i forbindelse med fjernelsen af pesticidnedbrydningsprodukter, vil det sandsynligvis kræve et andet reaktordesign i et separat behandlingstrin.

5.3 Konklusioner fra vurdering af overførsel af potentiale og skalérbarhed

- Potentialet for at fjerne DPC og DMS kan i nogle tilfælde overføres fra biologisk materiale i ét filter til et andet. Filtersand fra ét vandværk har fx vist potentiale for at fjerne pesticidnedbrydningsprodukterne DPC og DMS fra vand fra et andet vandværk.
- Bioargumentation med en MOB kultur (3 vol. %) kan stimulere potentialet for at fjerne DPC og DMS i filtersand.
- Bioargumentation med filtersand (50:50) fra et vandværk kan stimulere potentialet for fjernelsen af DPC og DMS på et andet vandværk.
- Der er ikke identificeret nogle optimeringsparametre blandt de undersøgte, dvs. metantilsætning, substratforhold, kobberkoncentration eller doseringsstrategi for at fjerne DPC eller DMS på vandværker.
- Potentialet for fjernelse af DPC og DMS er relativt lavt sammenlignet med det identificerede potentiale for nedbrydning af bentazon (positiv kontrol).
- Det identificerede potentiale for fjernelse af DPC og DMS er på nuværende tidspunkt ikke relevant i forhold til dansk drikkevandsbehandling med traditionel sandfiltrering med en opholdstid på ca. 20 min.

Konklusioner

Det overordnede formål med projektet var at undersøge potentialet for mikrobiologisk nedbrydning af DPC og DMS ved en co-metabolisk proces baseret på metanoxidation, med henblik på at udvikle en ny renseteknologi for disse stoffer til brug på danske vandværker. Projektet har gennem en lang række laboratorieforsøg foretaget en bred geografisk screening af nedbrydningspotentialet med materiale fra 10 forskellige vandværker, og undersøgt hvorvidt, nedbrydningspotentialet kan optimeres og overføres fra et vandværk til et andet. De overordnede konklusioner var:

- Der er observeret et potentiale for at fjerne DPC og DMS med filtersand, og der er indikationer på at dette potentiale er størst for materiale fra vandværker, der behandler vand med højt indhold af metan. Da der ligeledes er et vist fald i koncentrationen i de abiotiske kontroller, kan det ikke entydigt afklares, om fjernelsen skyldes mikrobiologisk nedbrydning.
- Der er ikke identificeret optimeringsparametre i blandt de undersøgte testforhold: tilsætning af metan (2-10 mg CH₄/L), substratforhold (3:1-3000:1), kobberkoncentration (1-1000 µg Cu²⁺/L) eller doseringsstrategi (hhv. udsultning og stimulering med metan).
- Bentazon blev fuldstændigt fjernet efter 7 dages kontakt med filtersand, hvilket var koblet til metanoxidation, hvorfor denne fungerede som en positiv kontrol af projektets metode- og forsøgsdesign.
- På baggrund af de observerede fjernelseshastigheder i batchforsøg vurderes det, at processen på nuværende tidspunkt ikke er tilstrækkelig hurtig til at være relevant for drikkevandsbehandling.

Resultaterne har således ikke givet belæg for udvikling af en ny renseteknologi med mikrobiologisk nedbrydning baseret på metanoxidation til fjernelse af DPC og DMS på vandværker. Projektet har imidlertid bidraget med vigtig viden, der belyser udfordringerne ved fund af pesticidnedbrydningsprodukter i dansk grundvand, hvilket giver vandforsyningerne et mere oplyst grundlag for at vælge fremtidig renseteknologier.

Referencer

- Benner, J., De Smet, D., Ho, A., Kerckhof, F. M., Vanhaecke, L., Heylen, K., & Boon, N. (2015). Exploring methane-oxidizing communities for the co-metabolic degradation of organic micropollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3609–3618. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6226-1>
- Christensen S.C.B., Larsen S.L., Asmussen O.W., Boe-Hansen, R., Nava, S.B., Afshar, S.V. & Albrechtsen H.-J. (2015). Ormebekæmpelse i vandværksfiltre – Forekomst og bekæmpelsesteknologi. Naturstyrelsen.
- Dedysh, S. N. & Dunfield P. F., 2017 in: T.J. McGenity et al. (eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*, Springer Protocols Handbooks, (2017) 231–247, DOI 10.1007/8623_2014_14, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014, Published online: 19 November 2014
- GEUS (2018). Forekomst af desphenylchloridazon og methyldesphenylchloridazon i grundvandet. GEUS-Notat, Geokemisk Afdeling. 14. Marts, 2018. Notat nr: 05-VA-18-01. J.nr. GEUS: 014-00250. De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland (GEUS), Energi-, Forsynings- og Klimaministeriet.
- Hansen, L. E. (2018). The potential of microbial degradation of the herbicides Bentazone, Chloridazon and its metabolites for Drinking Water Treatment Plants in, Potentialet for mikrobiel nedbrydning af herbiciderne Bentazon, Chloridazon og dets metabolitter for drikkevandsrensingsanlæg i Danmark. Master projekt, DTU Miljø, Danmarks Tekniske Universitet (DTU).
- Hedegaard, M. J., Arvin, E., Corfitzen, C. B., & Albrechtsen, H.-J. (2014). Mecoprop (MCP) removal in full-scale rapid sand filters at a groundwater-based waterworks. *Science of the Total Environment*, 499(1), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.052>
- Hedegaard, M. J. (2018). Microbial degradation of pesticides in rapid sand filters used for drinking water treatment. PhD-afhandling, DTU Miljø, Danmarks Tekniske Universitet. (DTU)
- Hummelshøj, T. F. (2021). Optimization of degradation of pesticide metabolites (DMS) via methane oxidation, Optimering af nedbrydning af pesticidmetabolitter (DMS) ved methanoxidation. Bachelor projekt, DTU Miljø, Danmarks Tekniske Universitet (DTU).
- Jupiter. GEUS' landsdækkende database for grundvands-, drikkevands-, råstof-, miljø- og geotekniske data: <http://jupiter.geus.dk>
- Milanovic, N., & Sykya, M. A. M. (2017). Co-metabolic degradation of pesticides by methanotrophic bacteria in material from Danish waterworks, Metanotrofe bakteriers co-metaboliske nedbrydning af pesticider i materiale fra danske vandværker. Bachelor projekt, DTU Miljø, Danmarks Tekniske Universitet (DTU).
- Nielsen, N. R. I., & Pedersen, M. N. (2019). Degradation of pesticides at water works, Nedbrydning af pesticider på vandværker. Bachelor projekt, DTU Miljø, Danmarks Tekniske Universitet (DTU).

Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., & Yoon, S. (2010). Methanotrophs and copper. *Fems Microbiology Reviews*, 34(4), 496–531. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x>

Thorling, L., Ditlefsen, C., Ernstsén, V., Hansen, B., Johnsen, A.R., & Troldborg, L., 2019: Grundvand. Status og udvikling 1989 – 2018. Teknisk rapport, GEUS 2019.

Whittenbury, R., Phillips, K.C. and Wilkinson, J.F., 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Microbiology*, 61(2), pp.205-218.

Bilag 1: Udvikling af forsøgsdesign og vurdering af metode ift. prøveudtagning, -opbevaring og analyseusikkerhed

Under nedbrydningsforsøgene for Ullerup Vandværk er der ved sidste prøvetidspunkt (dag 22) udtaget ekstra væskeprøver samt foretaget ekstra analyser heraf, Tabel B1. Dette er gjort med henblik på at vurdere følgende usikkerheder:

- A. Analyseusikkerhed (LC MS/MS) ved at gentage analysen af de enkelte væskeprøver
- B. Prøveudtagningen:
 1. Ved at gentage prøveudtagning med filtrering (2 µm nylon filter)
 2. Ved at udtage hhv. første og andet filtrat (dvs. 'skylle filter med prøve')
 3. Ved at centrifugere i stedet for filtrere.

Under screeningsforsøgene på Sjælsø vandværk anlæg II er der endvidere udtaget en række duplikater i batchforsøgene for at vurdere:

- C. Prøveopbevaring ved hhv. køleskab og fryser

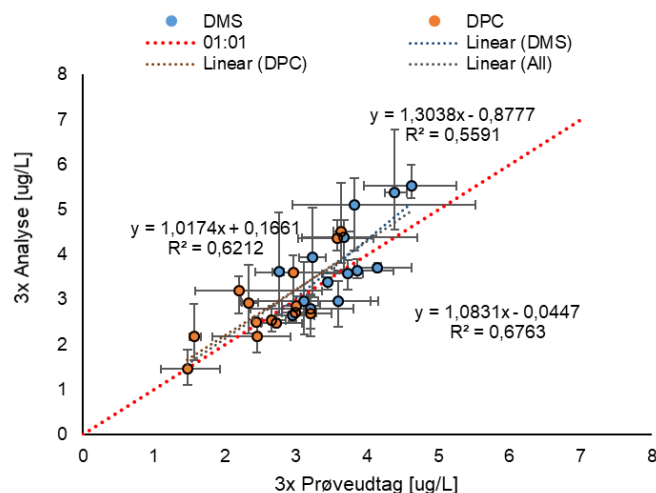
Tabel B1: Prøver udtaget og analyseret til vurdering af metode- og analyseusikkerhed ved nedbrydningsforsøg.			
ID	Metode	Forskyl filter	Analyse/prøve
f1.1	Filtrering	-	3
f1.2	Filtrering	+	1
f2.1	Filtrering	-	1
f2.2	Filtrering	+	1
f3.1	Filtrering	-	1
f3.2	Filtrering	+	1
c1	Centrifugering		3

Bilag 1.A Analyseusikkerhed

Pesticidnedbrydningsprodukterne er mål via LC MS/MS analyse. I analysen er der anvendt interne standarder med kendte koncentrationer til at kalibrere analysen. Den relative standardafvigelse på analysen (%RSD) er estimeret ved ni gentagne analyser af standarderne. RSD er for standarder i koncentrationsniveauet på 1 µg/L er målt til 25 % for analysen foretaget af prøver i screeningen på Ullerup Vandværk. Der er senere indkøbt kommercielle, deuterium-mærkede standarder indkøbt fra Dr Ehrenstorfer, hvilket har sænket usikkerheden (% RSD) på de enkelte analyser til 1-10 %. Den relative standardafvigelse (%RSD) for triplikat-bestemmelse af enkelte vandprøver varierer fra 1 til 32% og falder dermed inden for den estimerede analyseusikkerhed.

Bilag 1.B.1 Prøveudtagning (filtrering)

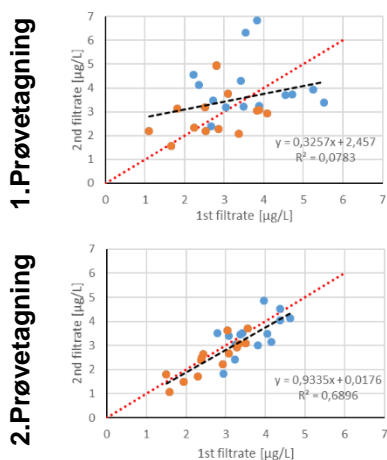
Analyse af tre vandprøver udtaget fra samme batchforsøg (flaske) på samme tidspunkt viser en gennemsnitlig RSD på ca. 14%, hvilket svarer til den RSD for triplikat-bestemmelse af én vandprøve. Der kan på baggrund af disse resultater ikke udledes en øget usikkerhed, som følge af prøvetagningen (filtrering uden skyl af filteret). Denne sammenhæng er illustreret i et krydsplot mellem triplikat-bestemmelserne i analysen og gentagne prøveudtagning fra samme batchforsøg, hvor resultaterne samler sig omkring 1:1-ratioen, Figur B1.B.



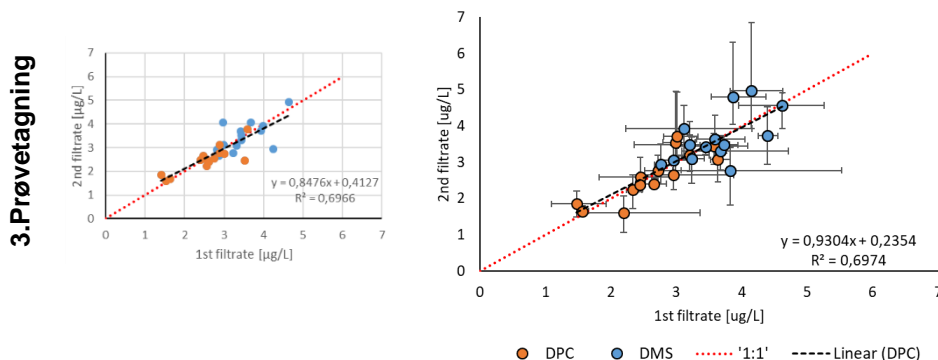
Figur B1.B1: Koncentrationer målt i triplikater hhv. væskeprøve analyseret tre gange (3x Analyse) over tre vandprøver fra samme batchforsøg (flaske) udtaget på samme tidspunkt (3x Prøveudtag) fra nedbrydningsforsøg med materiale fra Ullerup Vandværk.

Bilag 1.B.2 Skyl af filter med prøve

Der er udført undersøgelse med forskyl af filteret ved prøveudtagning. Her er den relative standardafvigelse (%RSD) er generelt lidt højere, når filtrene skylles med prøve forud for prøvetagning. Den gennemsnitlige RSD er ca. 18%, når filtrene skylles, sammenlignet med ca. 14%, når de ikke skylles. Der kan ikke udledes nogen korrelation mellem de målte koncentrationer for hhv. ikke-skyllede filtre (1st filtrate) og skyllede filtre (2nd filtrate), Figur B1.B2. Der er imidlertid observeret en ændret afvigelse over de tre gentagne prøvetagninger. Ved første prøvetagning er der en tendens til, at den målte koncentration uden skyl af filteret afviger mere fra den målte koncentration med skyl af filteret. Ved anden og tredje prøvetagning er denne variation mindre dvs. at de målte koncentrationer med og uden skyl af filteret samler sig om 1:1-linjen. Det kan evt. skyldes en mindre omrystning forud for 2. og 3. prøvetagning.



Over alle prøvetagninger

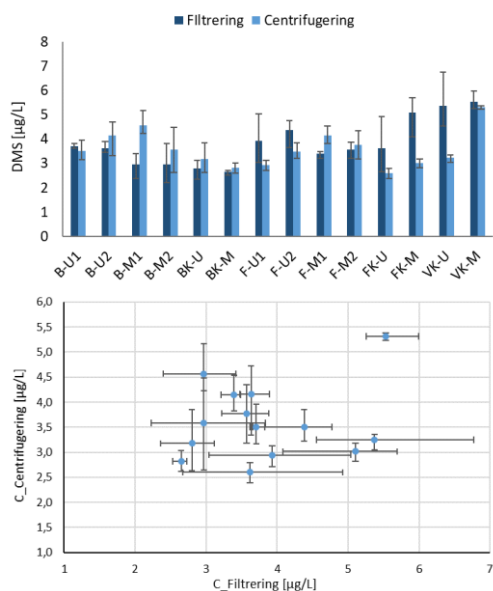


Figur B1.B2: Vurdering af usikkerhed ved metode for prøveudtagning hhv. gentag af prøvetagning og første filtrat (udtage direkte fra flaske gennem filter) og andet filtrat (skyl med prøve før udtag til analyse).

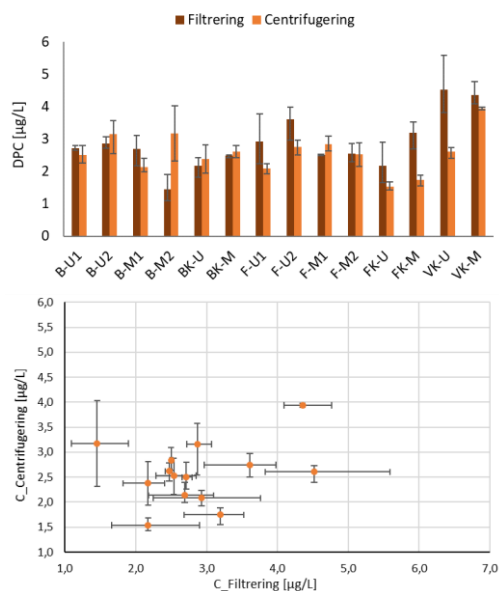
Bilag 1.B.3 Prøvehåndtering ved hhv. filtrering og centrifugering

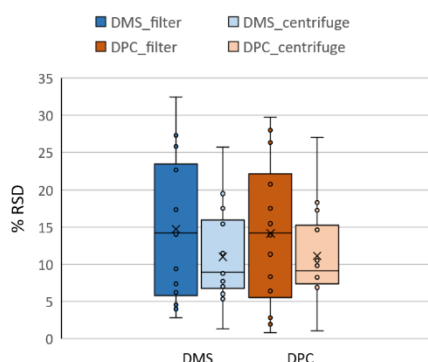
Væskeprøver udtaget fra samme batch er forsøgt forbehandlet med filtrering og centrifugering. Den relative standardafvigelse (%RSD) ved triplikat-bestemmelserne af en væskeprøve bliver generelt en smule mindre ved centrifugering sammenlignet med filtrering, Figur B1.B3. Dog er der en væsentlig risiko for gennembrud af partikler, som kan påvirke og ødelægge kolonnen på LC MS/MS instrumentet. Den gennemsnitlige RSD for triplikat-bestemmelserne er ca. 11%, når prøverne centrifugeres, sammenlignet med ca. 14%, når prøverne filtreres. Der kan ikke udledes nogen korrelation mellem de målte koncentrationer for hhv. filtrerede og centrifugerede prøver.

DMS



DPC





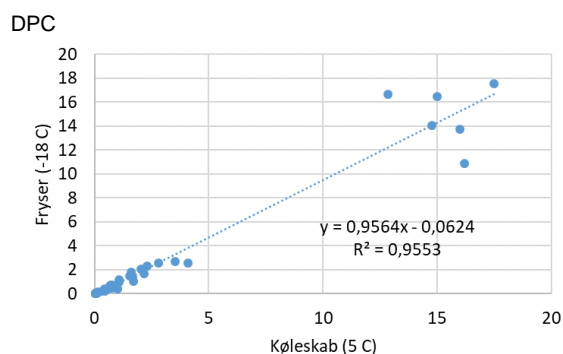
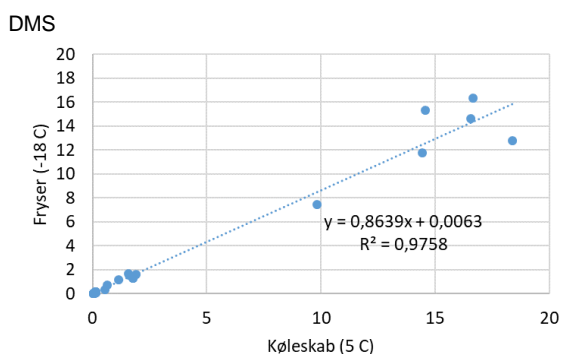
Figur B1.B3: Vurdering af usikkerhed ved metode for prøveudtagning hhv. filtrering og centrifugering. Relativ standardafvigelse fra triplikat-betømmelser (%RSD) for filtrerede og centrifugerede væskeprøver for henholdsvis DMS og DPC.

Bilag 1.C Prøveopbevaring ved hhv. køleskab og fryser

Under forsøg med Sjælsø Vandværk anlæg II, er der foretaget en undersøgelse af, hvorvidt prøveopbevaringen har betydning for den målte koncentration af pesticidnedbrydningsprodukt ved at udtage to gentagne prøver, som opbevares hhv. i køleskab ved 5 °C og i fryser ved -18 °C forud for analysen. Undersøgelsen er lavet på et større udsnit af prøver (n = 54) for både DPC og DMS.

Tabel B1.C: Statistisk vurdering (t-test) af effekten af prøveopbevaring ved hhv. køleskab og fryser forud for analyse med LC MS/MS.

	DMS	DPC
Fryser vs. køleskab		
Two-tailed, paired T-test		
Køleskab μ er sign. forskellig fra fryser μ	if $P < 0,05$	if $P < 0,05$
Køleskab μ er <u>ikke</u> sign. forskellig fra fryser μ	if $P > 0,05$	if $P > 0,05$
P	0,0504	0,2344
Resultat	ikke sign. forskellig	ikke sign. forskellig



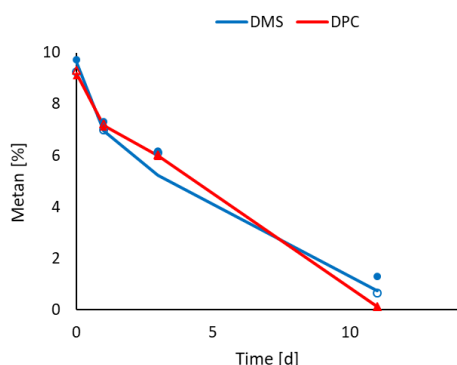
Figur B1.C: Vurdering af usikkerhed ved metode for prøveopbevaring hhv. køleskab og fryser målte koncentrationer af DMS og DPC ved LC MS/MS analyse.

Bilag 2: Ilt- og metanforbrug i nedbrydningsforsøg

Bilag 2.A GC måling fra screening af nedbrydningspotentialet på de forskellige vandværker

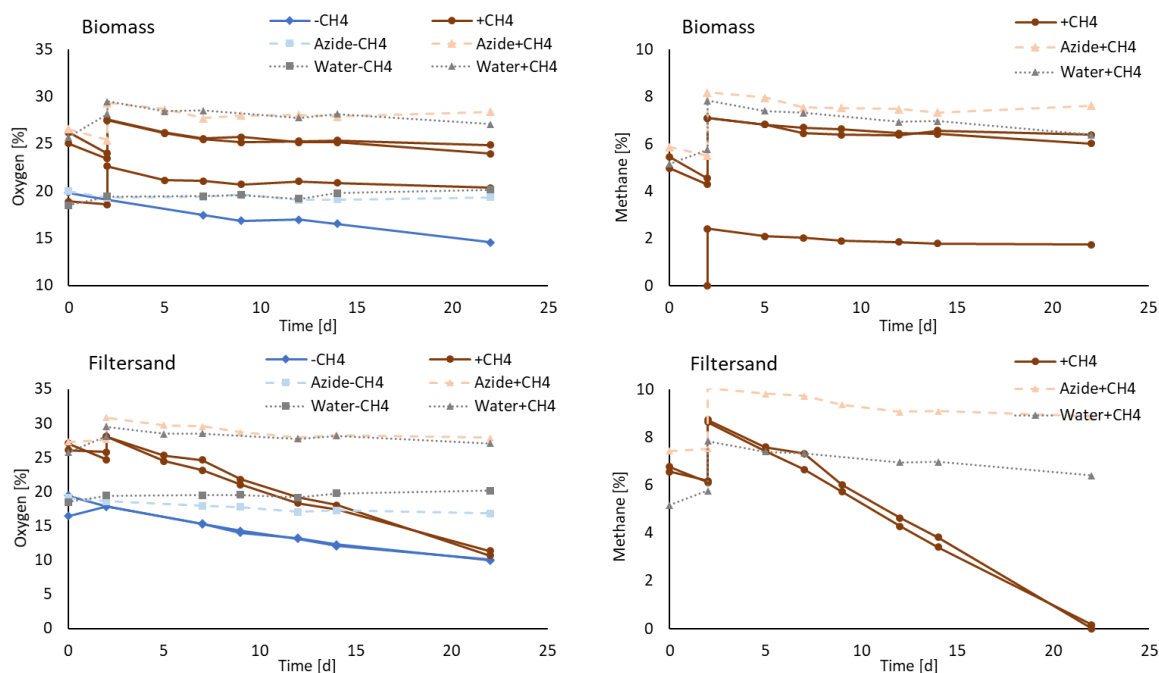
Den biologiske aktivitet er i screeningsforsøgene monitoreret ved analyse af ilt og metan. Dette er målt via GC-analyse af batchforsøgenes gasfase (head-space), hvor et mindre volumen (0,2 ml) er udtaget og sammensætningen er kvantificeret som vol. % af den totale mængde luft. Resultaterne er herunder præsenteret for hvert vandværk. Ved en stigning i vol. % er der tilsat ilt og metan i batchforsøgene.

Sjælsø Vandværk anlæg II



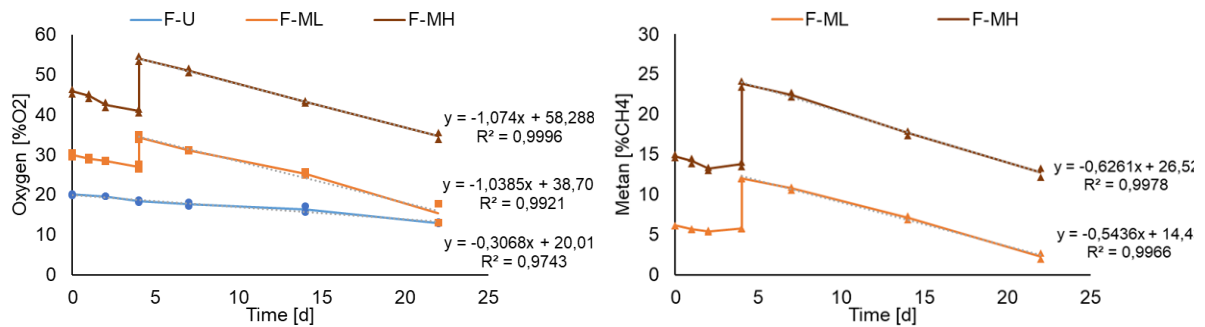
Figur B2.A1: Oxygen- og metankoncentrationer (volumen % i gasfasen) målt i batchforsøg med filtersand fra Sjælsø Vandværk anlæg II. Batchforsøg blev tilført metan på dag 14 efter igangsat nedbrydningsforsøg.

Ullerup Vandværk



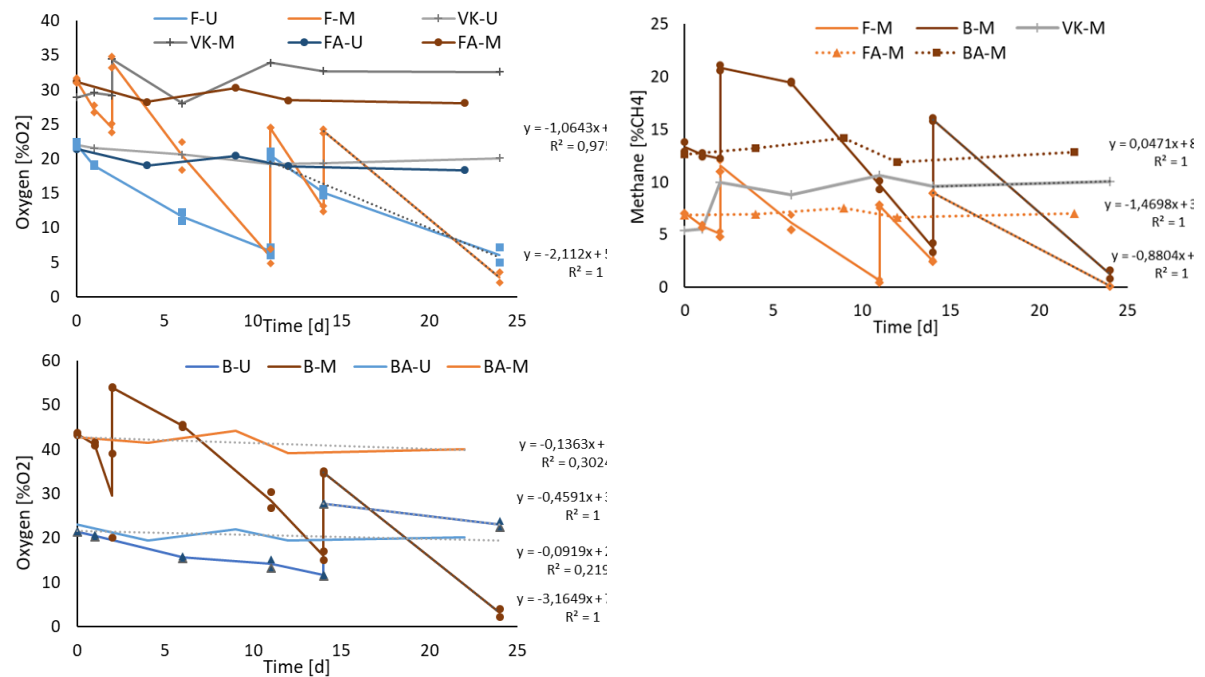
Figur B2.A2: Oxygen- og metankoncentrationer (volumen % i gasfasen) målt i batchforsøg med hhv. filtersand og bakteriebiomasse fra Ullerup Vandværk.

Nykøbing Falster Vandværk



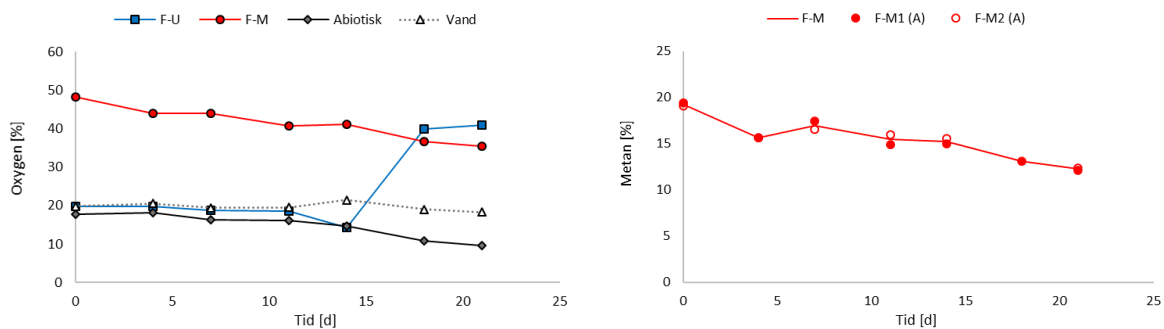
Figur B2.A3: Oxygen- og metankoncentrationer (volumen % i gasfasen) målt i batchforsøg med filtersand fra Nykøbing Falster Vandværk.

Stenholt Vandværk



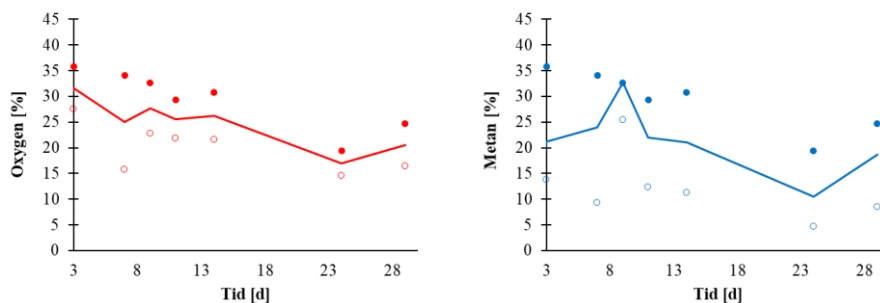
Figur B2.A4: Oxygen- og metankoncentrationer (volumen % i gasfasen) målt i batchforsøg med hhv. filtersand og bakteriebiomasse fra Anonymt Vandværk.

Skælskør Vandværk



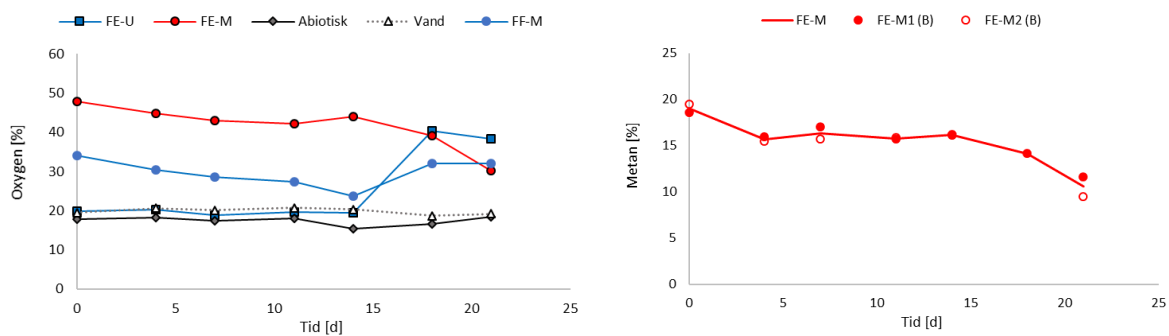
Figur B2.A5: Oxygen- og metankoncentrationer (volumen % i gasfasen) målt i batchforsøg med filtersand fra Skælskør Vandværk.

Staurbyskov Vandværk



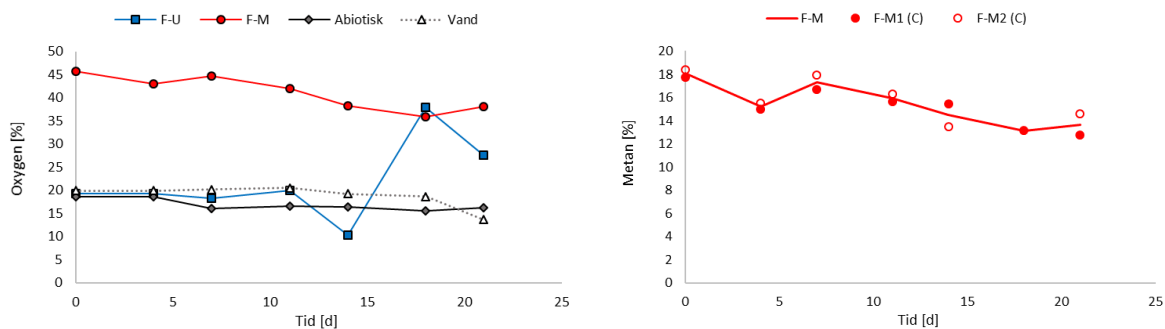
Figur B2.A6: Oxygen- og metankoncentrationer målt i batchforsøg med filtersand fra Staurbyskov Vandværk.

Svendborg Vandværk



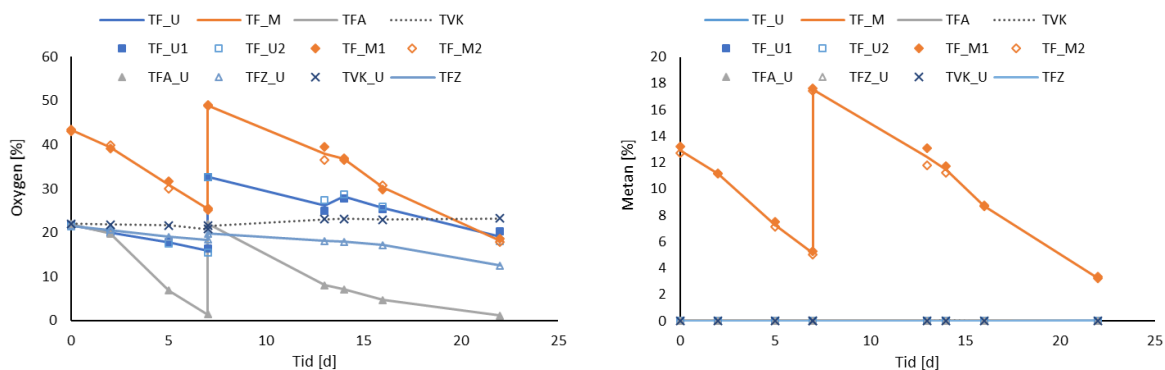
Figur B2.A7: Oxygen- og metankoncentrationer målt i batchforsøg med filtersand fra Svendborg Vandværk.

Kerteminde Vandværk



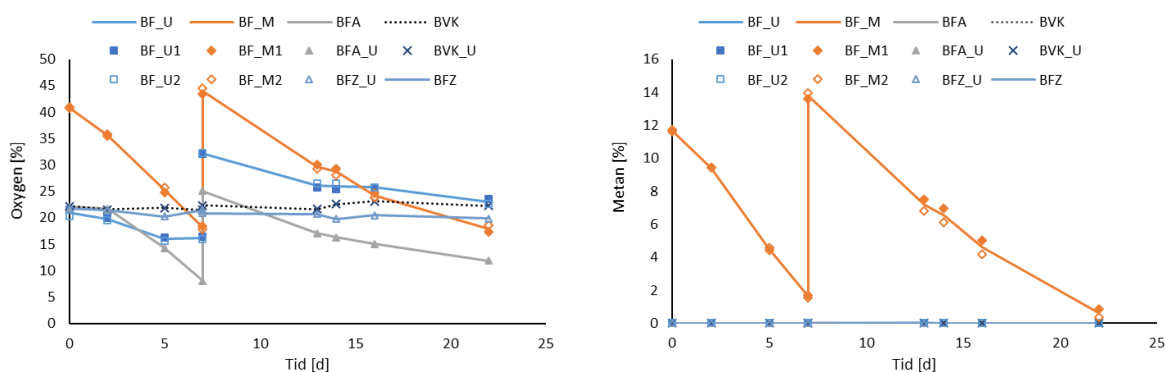
Figur B2.A8: Oxygen- og metankoncentrationer målt i batchforsøg med filtersand fra Kerteminde Vandværk.

Tolne Vandværk



Figur B2.A9: Oxygen- og metankoncentrationer målt i batchforsøg med filtersand fra Tolne Vandværk.

Bredkær Vandværk



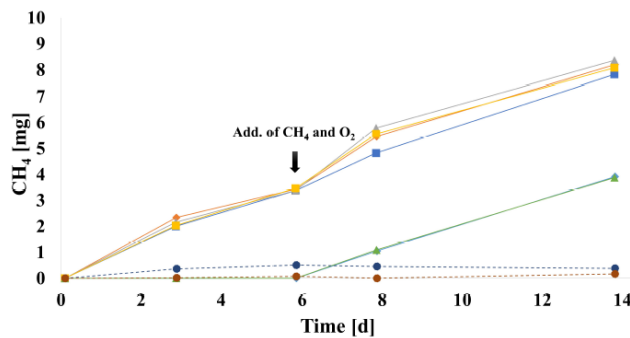
Figur B2.A10: Oxygen- og metankoncentrationer målt i batchforsøg med filtersand fra Bredkær Vandværk.

Bilag 2.B GC måling fra optimering af nedbrydningspotentialet

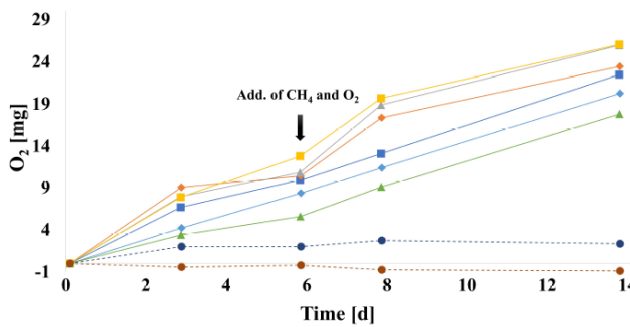
I optimeringsforsøgene er den biologiske aktivitet monitoreret ved GC-analyse af ilt og metan. Den målte vol. % er omregnet til en masse-koncentration i vandfasen ud fra antagelser om et to-fase system, og udviklingen er defineret som et akkumuleret forbrug over tid.

1. Substrat-forhold

■ no. 1 (0.5 µg/L) ◆ no. 2 (5 µg/L) ▲ no. 3 (50 µg/L) ■ no. 4 (500 µg/L)
◆ no. 5 (5 µg/L) CH4 ad. day 6 ▲ no. 6 (50 µg/L) CH4 ad. day 6 ● no. 7 (Abiotic - ZnCl2) ● no. 8 (Control - Water)



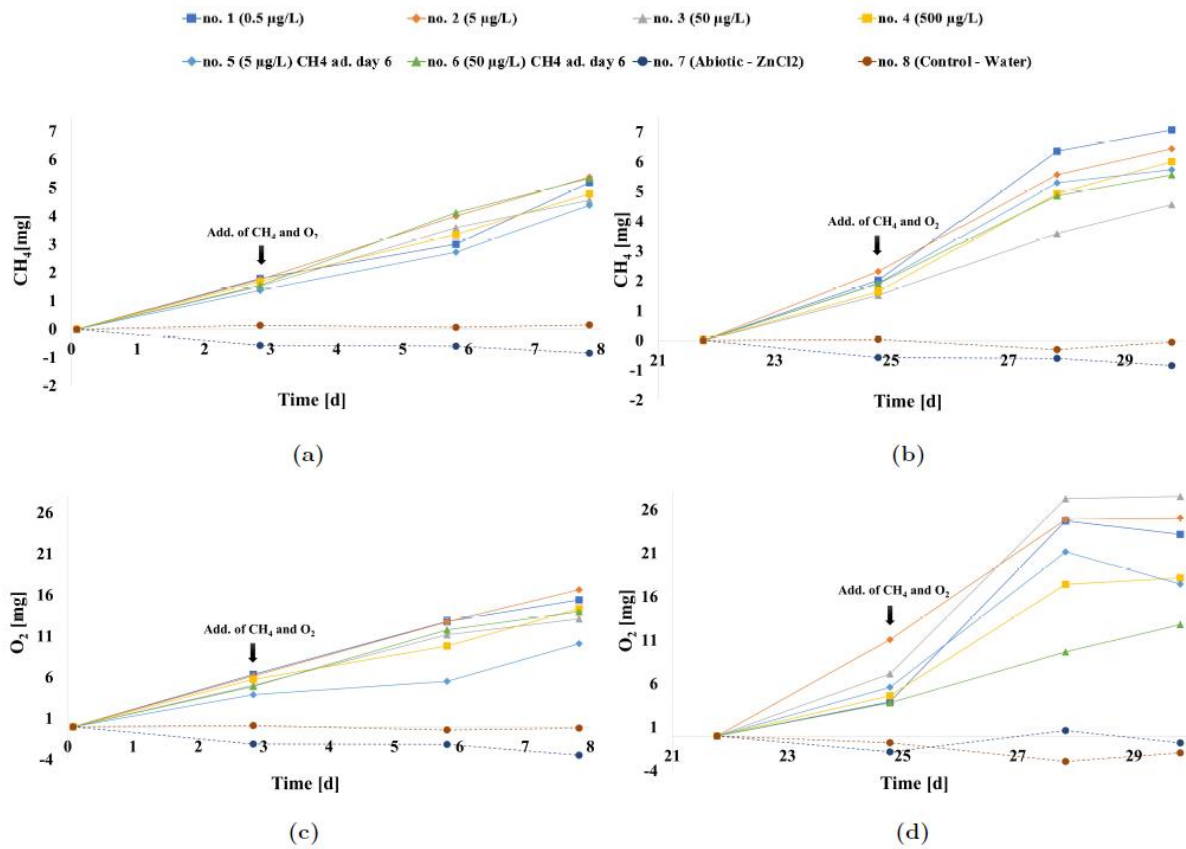
(a)



(b)

Figur B2.B1: Oxygen- og metanforbrug i batchforsøg med varierende substrat-forhold. Målte volumen procenter er omregnet til akkumuleret forbrug i masse (mg) over forsøgsperioden (Hummelshøj, 2021).

2. Varierende kobberkoncentrationer



Figur B2.B2: Oxygen- og metanforbrug i batchforsøg med varierende substrat-forhold. Målte volumen procenter er omregnet til akkumuleret forbrug i masse (mg) over forsøgsperioden (Hummelshøj, 2021).