

# STIMULERING AF CO-METABOLSK PESTICIDFJERNELSE I EKSISTERENDE SANDFILTRE PÅ DANSKE VANDVÆRKER



# STIMULERING AF CO-METABOLSK PESTICIDFJERNELSE I EKSISTERENDE SANDFILTRE PÅ DANSKE VANDVÆRKER

**DATO:** 10-  
03-23

**Projekt ID:** 54-2019

**Udgiver:**

Teknologisk Institut

**Udarbejdet af:**

Caroline Kragelund Rickers, Lone Tang, Lisbeth Damkjær Christensen, Teknologisk Institut

**Finansiering:**

Vejledningen er finansieret af  
VUDP, Vandsektorens Udviklings- og Demonstrationsprogram

**Samarbejdspartnere:**

Hjørring Vandselskab A/S, Verdo Vand A/S, Frederikshavn Vand A/S og TREFOR Vand A/S

**Kategori (Spildevand, drikkevand eller klimatilpasning):**

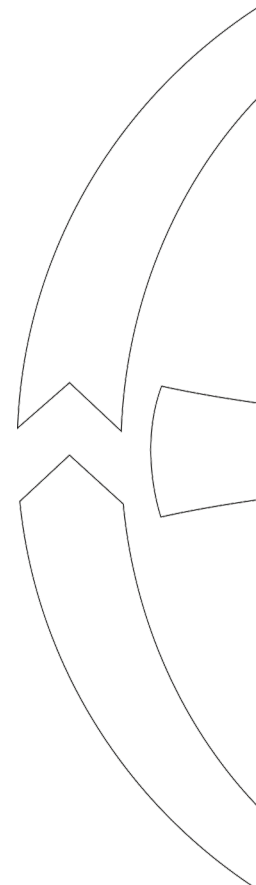
Drikkevand

---

## Indholdsfortegnelse

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Sammenfatning</b>                         | <b>3</b>  |
| <b>2</b> | <b>English summary</b>                       | <b>3</b>  |
| <b>3</b> | <b>Introduktion</b>                          | <b>7</b>  |
| <b>4</b> | <b>Projektets betydning for vandbranchen</b> | <b>9</b>  |
| 4.1      | Marked og/eller anvendelsesmuligheder        | 9         |
| 4.2      | Næste skridt                                 | 9         |
| 4.3      | Formidlingsplan                              | 10        |
| <b>5</b> | <b>Projektet</b>                             | <b>11</b> |
| 5.1      | Formål                                       | 11        |
| 5.2      | Output                                       | 11        |
| 5.3      | Projektresultater                            | 11        |
| 5.4      | Konklusion                                   | 29        |
| <b>6</b> | <b>Litteraturliste</b>                       | <b>31</b> |

Fejl! Bogmærke er ikke defineret.



# 1 Sammenfatning

Under udarbejdelse af projektansøgningen og under gennemførelse af projektet om co-metabolsk pesticidfjernelse er der løbende udkommet videnskabelig litteratur, der dokumenterer co-metabolsk fjernelse af visse pesticider i sandfiltre på vandværker. Pesticiderne omfatter bentazon mechlorprop, trichloroethen, benzotriazole og 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Hedegaard et al., 2014; Hedegaard et al., 2018; Wang et al., 2019; Wang et al., 2021). Nærværende projekt havde derfor til formål at undersøge mulig co-metabolsk nedbrydning af de oftest fundne pesticidrester, nemlig N,N-dimethylsulfamid (DMS) og desphenyl-chloridazon (DPC), som findes i ca. 30 % af alle boringer (Geus, 2020). DMS og DPC er nedbrydningsprodukter; DMS fra tolylfuamid og DPC fra chloridazon. Hvis det var muligt at nedbryde de omtalte stoffer co-metabolsk, kunne der opstilles en styringsmodel for, hvordan vandværker sikrer de mest optimale forhold for nitrifikanter og metanoxiderende bakterier, som naturligt er til stede i sandfiltre. Data fra de deltagende forsyninger med hensyn til tilstedeværelse af ammonium, metan, DMS og DPC blev gennemgået, og der blev analyseret for tilstedeværelsen af de bakterier, der muliggør den co-metabolske oxidation, nemlig ammonium- (AOB), nitrit- (NOB) og metanoxiderende bakterier (MOB) vha. molekylær qPCR-analyse.

Under gennemførelse af forsøg i laboratorie- og pilotskala blev tilstedeværelsen af disse bakterier (AOB, NOB og MOB) monitoreret for at sikre, at grundlaget og det metabolske potentiale for en co-metabolsk nedbrydning af DMS og DPC var til stede i sandprøver indhentet fra de deltagende forsyninger. Der blev gennemført flere kolonneforsøg i laboratorieskala i bestræbelserne på at dokumentere en eventuel mikrobiologisk nedbrydning af de udvalgte pesticidrester - både metabolsk og co-metabolsk nedbrydning.

Under de initiale kolonneforsøg med konstant stimulering ved brug af tilført metan kunne der observeres en reduktion af den initiale koncentration af tilsat DMS og DPC (Tabel 3). Ved yderligere tilsætning af ammonium til de samme/identiske kolonner kunne det ikke for DMS afgøres, om tilsætningen af ammonium havde en positiv effekt i kombination med metan. Der blev observeret en markant reduktion af DPC, men effekten af diverse tilsætninger/stimulanter pegede ikke entydigt på en fremadrettet strategi ift. co-metabolsk stimulering. De opfølgende forsøg målrettet stimulering af nitrifikanter (Figur 4) bekræftede observationerne fra Hedegaard et al., 2018, nemlig at ammonium ikke havde nogen betydelig effekt på nedbrydningen af de undersøgte stoffer.

Kolonneforsøg i laboratorieskala målrettet stimulering af nitrifikanter blev igen opsat med frisk sand fra Stauerby Skov Vandværk. Formålet var at undersøge co-metabolsk nedbrydning af DPC med indlagte sulteperioder. Resultaterne fra Hedegaard et al., 2019, hvor en sulteperiode med metan viste sig at stimulere den co-metabolske nedbrydning af flere phenoxysyrer (MCPA og MCPP), inspirerede til at afprøve denne tilgang. Derfor blev forsøgsopstillingen modificeret, så perioder med sult (ved brug af perioder med hanevand) kunne testes for at undersøge, om disse betingelser ville kunne fremme den co-metabolske nedbrydning. En udfordring i forsøget var, at den mikrobielle aktivitet (primært AOB og NOB) falder over tid ved opsætning i laboratoriet, hvilket indikerer, at der muligvis mangler mikronæringsstoffer eller lignende. Grundet store analyseusikkerheder kunne der ikke observeres nogen signifikant effekt ved co-metabolsk stimulering, hverken med eller uden sulteperioder. Sulteperioden i laboratorieskalaforsøget var af en uges varighed (uge 3 hhv. uge 5), hvor der ikke blev tilført hverken ammonium eller kobber.

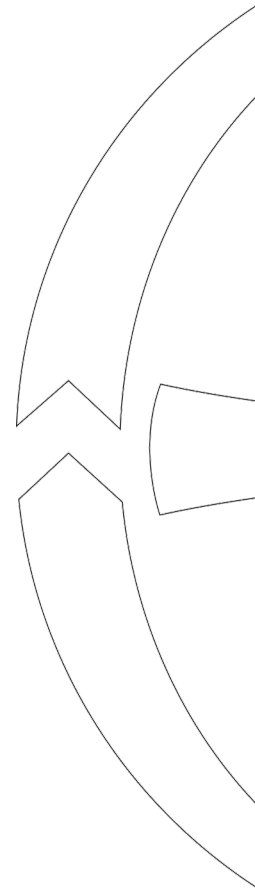
Under det efterfølgende eksperiment i pilotskala, der var målrettet stimulering af nitrifikanter ved Vilstrupvandværket under Verdo, var det muligt - sammenlignet med

---

kontrolkolonnerne - at fremme populationen af nitrifikanter (både AOB og NOB) i de stimulerede kolonner.

På trods af stimuleringen af nitrifikanter blev der imidlertid ikke observeret en reduktion i DPC-koncentrationen i løbet af de 110 dage, som eksperimentet varede. Tilsvarende resultater blev observeret ved stimulering med metan af de metanoxiderende bakterier. Igen sås en generel stigning både i antallet af totalbakterier og i andelen af de målrettede metanoxiderende bakterier. Dog blev der ikke observeret nogen fjernelse eller nedbrydning af DMS i løbet af de 55 dage, som eksperimentet varede.

Konklusionen på alle forsøgene var, at der kunne observeres indikationer for en mindre, mikrobiel nedbrydning af DMS og DPC under forsøgene i laboratorieskala, men at det ikke har været muligt at tilskrive nedbrydningen co-metabolsk fjernelse. Under forsøgene i pilotskala blev der ikke observeret nogen reduktion af hverken DMS eller DPC, og derfor ser co-metabolsk stimulering ikke ud til at være en farbar vej til fjernelse af rester af netop disse to pesticider. Trods det faktum, at det meget sandsynligt ville være muligt at fremme en mikrobiologisk medieret nedbrydning af andre pesticider med den beskrevne co-metabolske proces, er det nu tydeligt, at der vil være behov for at anvende en anden teknologisk tilgang til fjernelse af rester af DMS og DPC; fx filtrering med aktivt kul og/eller resiner.



---

## 2 Summary

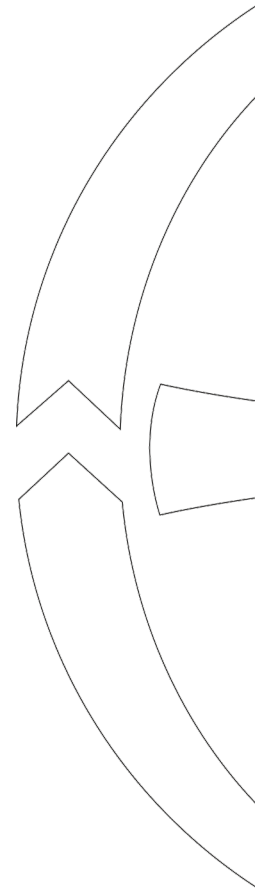
During the preparation of the project application and during the implementation of the project on co-metabolic pesticide removal, scientific literature has been continuously published documenting the co-metabolic removal of pesticides in sand filters at waterworks. The pesticides include bentazon, mecoprop, trichloroethene, benzotriazole, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Hedegaard et al., 2014; Hedegaard et al., 2018; Wang et al., 2019; Wang et al., 2021). The aim of this project was to investigate the possible co-metabolic degradation of the most frequently found pesticide residues, such as N,N-dimethylsulphamide (DMS) and desphenyl-chloridazon (DPC) found in approx. 30 % of all boreholes (Geus, 2020). DMS and DPC are degradation products; DMS from tolyfluamide and DPC from chloridazon. If it were possible to break down the mentioned substances co-metabolically, a control model could be created on how the waterworks could ensure the most optimal conditions for nitrifiers and methane-oxidizing bacteria naturally present in sand filters. The data from the participating waterworks on the presence of ammonium, methane, DMS and DPC were reviewed, and the analysis for the presence of the bacteria enabling co-metabolic oxidation, namely ammonium- (AOB), nitrite- (NOB), and methane-oxidizing bacteria (MOB), was carried out using molecular qPCR analysis.

During laboratory and pilot scale tests, the presence of these bacteria (AOB, NOB and MOB) was monitored to ensure that the foundation and the metabolic potential for a co-metabolic degradation of DMS and DPC were present in sand samples obtained from the participating waterworks. Several laboratory-scale column experiments were carried out to document possible microbiological degradation of the selected pesticide residues both metabolic and co-metabolic degradation.

During the initial column experiments with constant stimulation with added methane, a reduction in the initial concentration of the added DMS and DPC could be observed (see Table 3). After further addition of ammonium to the same/identical columns, it could not be determined for DMS whether the addition of ammonium had a positive effect with methane. A significant reduction of DPC was observed, but the effect of various additives/stimulants did not clearly show a future strategy for co-metabolic stimulation. The follow-up experiments targeting the stimulation of nitrifiers (Figure 4) confirmed the observations made in Hedegaard et al., 2018, namely that ammonium had no significant effect on the degradation of the investigated substances.

Laboratory-scale column experiments targeted on stimulation of nitrifiers were once again set up with new sand from the waterworks - Stauerby Skov Vandværk. The aim was to investigate co-metabolic degradation of DPC with starvation periods. The results from Hedegaard et al., 2019, where starvation period with methane showed to stimulate the co-metabolic degradation of several phenoxy acids (MCPA and MCPP), gave inspiration to test this approach. Therefore, the experiment setup was adjusted, so that the period of starvation (using periods with tap water) could be tested to see whether these conditions facilitated the co-metabolic degradation. A challenge in this experiment was that the microbial activity (primarily AOB and NOB) decreases over time in a laboratory setup, which indicates that there may be a lack of micronutrients or similar. Due to great analytical uncertainties, no significant effect with co-metabolic stimulation could be observed with or without starvation periods. The starvation period at the laboratory-scale experiment lasted 1 week (week 3 and week 5), where neither ammonium nor copper were added.

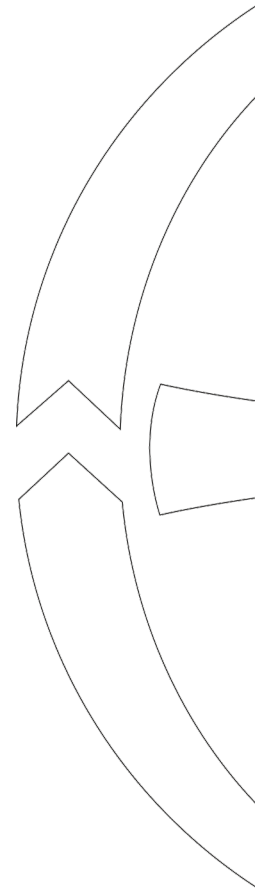
During the subsequent experiment at pilot scale, a targeted stimulation of nitrifiers was carried out at the waterworks - Vilstrup vandværket under Verdo, where it was possible,



compared to control columns, to promote the population of nitrifiers (both AOB and NOB) in the stimulated columns.

However, despite the stimulation of nitrifiers, no reduction in DPC concentration was observed during the 110 days of the experiment. Similar results were observed with methane with the methane-oxidizing bacteria. Again, a general increase could be seen in both the number of total bacteria and in the proportion of the targeted methane-oxidizing bacteria. However, no removal or degradation of DMS was observed during the 55 days of the experiment.

The conclusion of all experiments was that indication of a minor microbial degradation of DMS and DPC could be observed during the laboratory-scale experiments, but that it was not possible to attribute the degradation to co-metabolic removal. During the pilot-scale experiments, no reduction of either DMS or DPC was observed, and thus co-metabolic stimulation did not appear to be a viable path towards the removal of residues of these two pesticides. Even though it would very likely be possible to promote a microbiologically mediated degradation of other pesticides with the described co-metabolic process, it is now clear that it will be necessary to use a different technological approach for the removal of residues of DMS and DPC, e.g., filtration with activated carbon and/or resins.



### 3 Introduktion

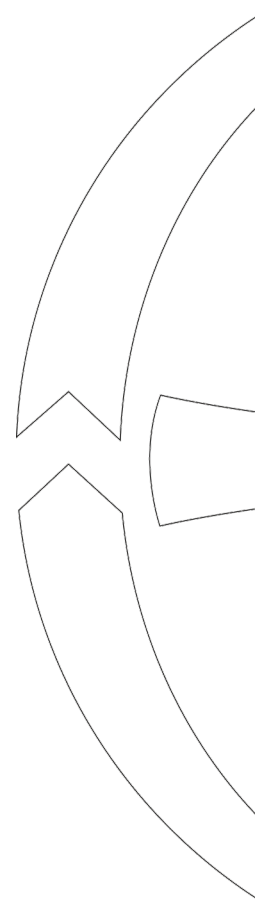
Dette projekt fokuserer hovedsageligt på potentialet for en biologisk fjernelse af pesticidresterne N,N-dimethylsulfamid (DMS) og DPC (desphenyl-chloridazon) i sandfiltre på danske vandværker. DMS findes i hver tredje boring i koncentrationer over grænseværdien, hvilket allerede har resulteret i lukning af grundvandsboringer. DMS og DPC, der er de hyppigst forekommende pesticidrester i drikkevandsboringer, er fundet i henholdsvis 31,5 % og 29,8 % af boringerne. De fundne koncentrationer er ofte lave, men der er observeret overskridelser af kravværdien på 0,1 µg/l i 16,8 % og 5,7 % af boringerne for henholdsvis DMS og DPC (GEUS 2020).

Nyere forskning har dokumenteret et hidtil uudnyttet mikrobielt potentiale i sandfiltre. Metanoxiderende bakterier (MOB), som er en naturlig del af et sandfilters mikrobiologiske samfund, omsætter foruden metan også visse pesticider og pesticidrester (co-metabolsk nedbrydning) (Hedegaard et al., 2018; Papadopoulou et al., 2019). Nedbrydningen skyldes, at enzymet metanmonooxygenase (pmoA), der omsætter metan, også uspecifikt kan omsætte andre forbindelser, herunder pesticider. MOB kan co-metabolsk omsætte fx bentazone, mechlorprop, trichloroethen, benzotriazole og 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Hedegaard et al., 2014; Hedegaard et al., 2018; Wang et al., 2019; Wang et al., 2021). Det resterer at blive afklaret, hvorvidt de hyppigst forekommende pesticidrester DMS og DPC kan omsættes co-metabolsk ved metanoxidation.

En anden gruppe af bakterier i sandfiltrene, ammoniumoxiderende bakterier (AOB), oxiderer ammonium i sandfiltret vha. enzymet ammonium monooxygenase (amoA), der ligesom metan-monooxygenase uspecifik kan omsætte andre forbindelser, fx pesticidet 1,2,4 triazole (Wu et al., 2019). AmoA-enzymet blev dog ikke identificeret som værende betydende ift. co-metabolsk oxidation af bentazon (Hedegaard et al., 2020). Enzymerne pmoA og amoA er trods deres forskellige funktioner i hhv. MOB- og AOB-mikrober strukturelt og evolutionært tæt beslægtede (Erwin et al., 2005), hvilket forklarer det fælles træk uspecifikt at kunne nedbryde forskellige stoffer (co-metabolsk). Fra tidligere projekter om lægemiddelfjernelse fra spildevand kendes AOB's co-metabolske nedbrydning, da fjernelsen af visse lægemidler var direkte korreleret med en høj fjernelsesgrad for ammonium (Xu et al., 2017; Tang et al., 2017).

Biologisk metan- og ammoniumoxidation er således naturligt forekommende processer i sandfiltre på danske vandværker, og bakterier med co-metabolske egenskaber kan have et uudnyttet potentiale for yderligere omsætning af de problematiske pesticidrester. AOB'ers potentiale for co-metabolsk reduktion af pesticidrester vil - såfremt der kan stimuleres co-metabolsk pesticidfjernelse - have et bredere sigte sammenlignet med MOB. Årsagen er, at mange vandværker kun har ubetydelige mængder af metan i det oppumpede grundvand og dermed en mindre MOB-population, der kunne fremme pesticidnedbrydningen i sandfiltrene.

I nærværende studie ønskes den co-metabolske kapacitet af de naturlige MOB'er og AOB'er fra eksisterende sandfiltre undersøgt i laboratorie- og pilotskala for senere udnyttelse af potentialet i sandfiltre i fuldskala på danske vandværker til fjernelse af de uønskede pesticidrester.



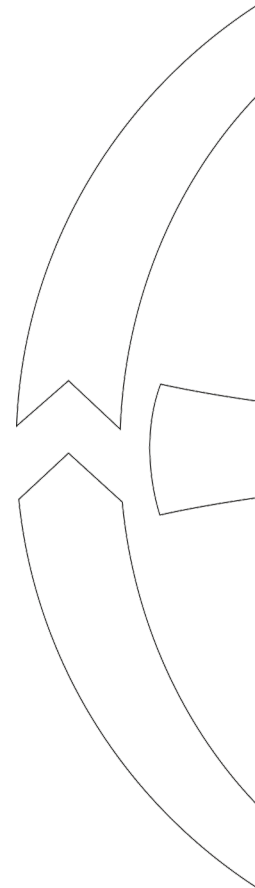
---

Projektet opdeles i tre arbejdsplaner:

**Arbejdsplan 1:** Her evalueres den tilgængelige videnskabelige litteratur ift. rapporterede observationer om mulig co-metabolisk nedbrydning af pesticidrester. Desuden er der gennemgået data fra de deltagende forsyninger ift. identifikation af mulig co-metabolisk nedbrydning i sandfiltrene.

**Arbejdsplan 2:** Her tages der udgangspunkt i mikrokosmosforsøg målrettet en stimulering af mulig co-metabolisk nedbrydning af DMS og DPC. Der arbejdes med stimulering af nitrifikanter og metanoxiderende bakterier i kolonner i laboratorieskala. Rammebetingelserne for stimulering af den co-metabolske nedbrydning skal være realistiske, dvs. som observeret ved danske vandværker. Balancen imellem tilgængeligheden af det primære substrat (metan for MOB, ammonium for AOB) vides at spille en rolle ift. co-metabolisk nedbrydning, ligesom sporstoffer i lave koncentrationer (fx kobber) kan fremme co-metabolisk nedbrydning. Dette arbejde danner basis for at udvikle styringsmodeller til vandværker. Styringen, som sikrer tilførsel af vand fra borerer med specifik vandsammensætning, har til hensigt at stimulere den co-metabolske nedbrydning af pesticidrester uden at kompromittere sandfiltrets øvrige funktioner.

**Arbejdsplan 3:** Her arbejdes der målrettet med opstillinger af pilotskalaforøg med stimulering af ammoniummedieret co-metabolisk nedbrydning af DPC og metanmedieret co-metabolisk nedbrydning af DMS ved hhv. Verdo i Randers og Hjørring Vand. Hvis fjernelsen af hhv. DMS og DPC sker ved hjælp af co-metabolisk stimulering, afprøves styringsmodellerne mhp. stimulering af bakterierne MOB'er og AOB'er, som muliggør den co-metabolske nedbrydning. Stimuleringen kunne fx være at sikre tilførsel af vand med højt indhold af ammonium, kobber e.l.



## 4 Projektets betydning for vandbranchen

DMS- og DPC-fjernelse er relevant for vandværker landet over. I 2020 blev der fundet rester af netop disse pesticider i hhv. 31,5 % og 29,8 % af borerne med en overskridelse af kravværdien i hhv. 16,8 % og 5,7 % af borerne. En fjernelse af DMS og DPC ved stimulering af en co-metabolsk nedbrydning ville være en attraktiv løsning med en stor resource- og miljømæssig gevinst for forsyningerne. Projektets resultater illustrerer desværre, at det er vanskeligt at stimulere de ammonium- og metanoxiderende mikroorganismer til co-metabolsk at omsætte rester af pesticiderne DMS og DPC. Umiddelbart er det nødvendigt at se efter alternative fjernelsesmetoder såsom filtrering med aktivt kul og resiner eller en direkte metabolisk nedbrydning.

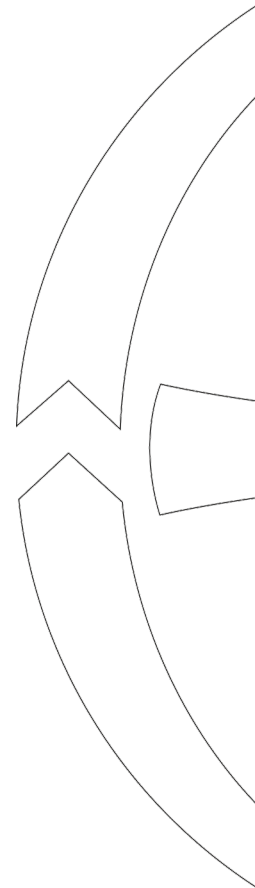
Data genereret i dette projekt bidrager således til at identificere og validere, hvilke teknologiske muligheder der eksisterer i dag for reduktion af DMS og DPC fra grund-/drikkevand. Resultaterne fra projektet viser desværre tydeligt, at co-metabolsk fjernelse af rester af de undersøgte pesticidrester DMS og DPC direkte i sandfiltre ikke er en mulig løsning.

### 4.1 Marked og/eller anvendelsesmuligheder

Fund af pesticider/pesticidrester udgør en stigende trussel mod kontinuerlig rent drikkevand. Dertil har indførelsen af massescreeningsundersøgelser i både grundvand og drikkevandsboringer afsløret flere problematiske stoffer. Der er således et akut behov for at udvikle en bæredygtig teknologisk tilgang, der sikrer, at DMS og DPC og andre problematiske stoffer fjernes fra drikkevandet, inden vandet ledes til forbrugerne. Co-metabolsk pesticidfjernelse ved stimulering af naturlige AOB'er og MOB'er har i nærværende projekt vist sig ineffektiv til reduktion af netop de nævnte pesticidrester i sandfiltrene, og der pågår flere forsknings- og udviklingsprojekter målrettet identifikation af mulige effektive og bæredygtige adsorbenter.

### 4.2 Næste skridt

Tidligere rapporter omhandlende fjernelse af miljøfremmede stoffer i spildevand og drikkevand indikerede, at en co-metabolsk fjernelse af pesticider/pesticidrester kunne være en mulighed. Imidlertid har en systematisk evaluering af co-metabolsk stimulering af hhv. nitrifikanter og metanoxiderende bakterier desværre ikke resulteret i en fjernelse af de testede pesticider/pesticidrester (DMS og DPC) i de undersøgte sandfiltre. Derfor vurderes denne tilgang ikke at være farbar i forhold til en mikrobiologisk reduktion af pesticider ved de danske vandværker. Andre tiltag til håndtering af pesticidfjernelse vil derfor pege i retning af aktiv kulfiltrering og/eller brug af resiner. Dog adsorberer visse stoffer såsom DMS relativt dårligt til aktivt kul generelt, hvorfor der er behov for en målrettet indsats for at identificere bedre renseløsninger. Mulig identifikation af egnede adsorbenter til fjernelse af DMS arbejdes der med i bl.a. VUDP-projektet *Identifikation af robust filtermateriale til effektiv reduktion af problematiske pesticidrester i drikkevand* (2020). Her er formålet at identificere det eller de nye, mest effektive og bæredygtige filtermateriale(r) til fremtidig effektiv fjernelse af DMS og DPC.



---

### 4.3 Formidlingsplan

I forhold til den formidlingsplan, der blev udarbejdet i forbindelse med projektets opstart, har der været omtale af projektet ved brug af forskellige medier. Projektet har været præsenteret på Teknologisk Instituts hjemmeside, ligesom der blev udarbejdet en film om projektet, som er tilgængelig på DANVAs hjemmeside (<https://www.danva.dk/vden/vudp/hvor-er-vandsektoren-paa-vej-hen/>). Under projektet med bl.a. laboratorie- og pilotskalaopstillingerne har der været tilknyttet 2 bachelorstuderende fra Biologisk Institut fra Aarhus Universitet. Der er udarbejdet dels et LinkedIn-opslag om pilotskalaopstillingerne (opstillet ved hhv. Hjørring Vand og Verdo), dels et opslag i forbindelse med de tilknyttede bachelorstuderendes eksamen. Resultaterne har været præsenteret på Danish Water Forum 2022, Dansk Vand Konference i forbindelse med Young Water Professionals. En temadag var planlagt til afholdelse under forudsætning af positive resultater. Da disse udeblev, er der ikke gennemført en temadag omhandlende co-metabolsk pesticidfjernelse. Der vil i forbindelse med et andet projekt omhandlende kemisk fjernelse af DMS blive afholdt en temadag i samarbejde med miljøklyngen CLEAN, som forventes afholdt i løbet af efteråret i 2022.

---

## 5 Projektet

### 5.1 Formål

Formålet med projektet var at bidrage til løsningen af pesticidforureninger i drikkevandsforsyningen ved at undersøge, om rester af pesticiderne DPC og DMS kunne omsættes co-metabolsk ved at stimulere de naturlige ammonium- og/eller metanoxiderende mikroorganismer direkte i sandfiltrene. Stimuleringen skulle foregå under realistiske betingelser i sandfiltrene (dvs. dosering af metan, ammonium og sporstoffer i niveauer, som observeres i dansk drikkevand). Under forudsætning af en succesfuld, øget pesticidnedbrydning forårsaget af co-metabolsk aktivitet skulle der opstilles en styringsmodel, så de stimulerende betingelser kunne opnås.

### 5.2 Output

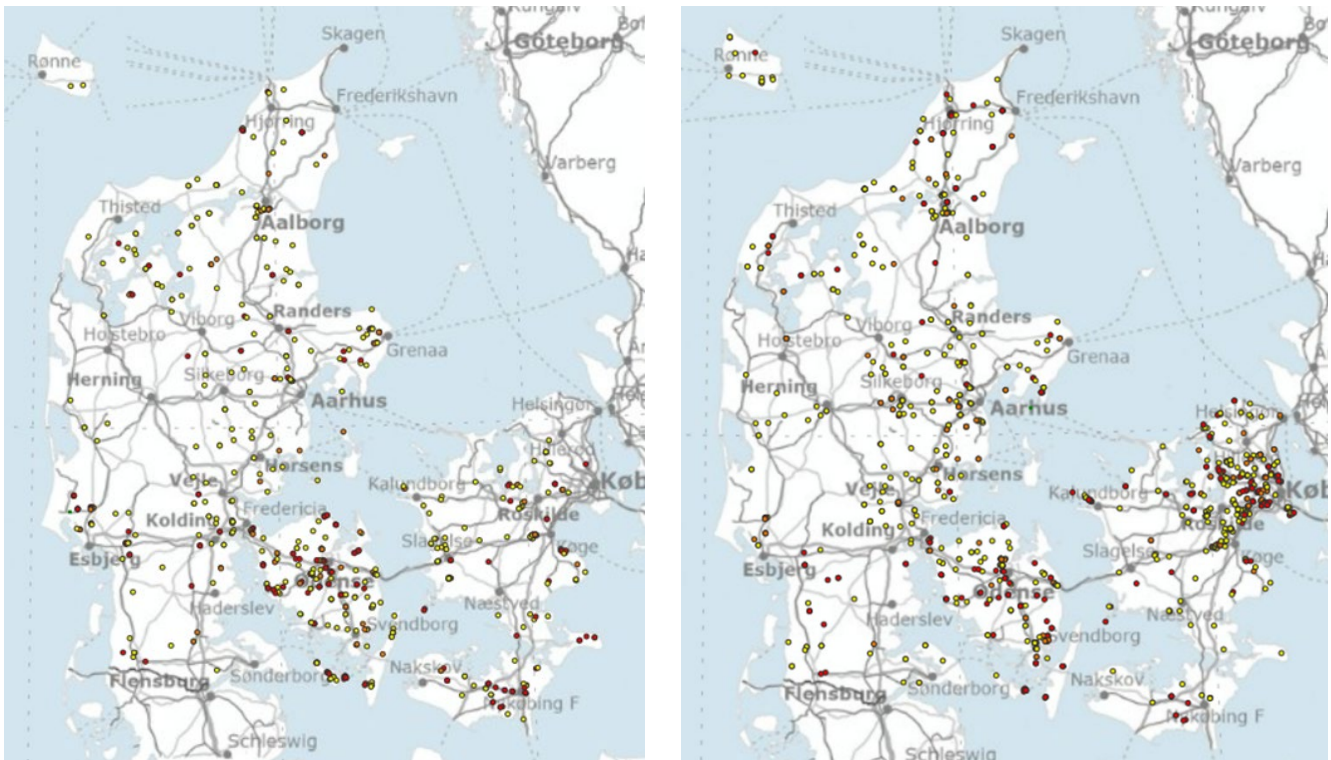
Der blev helt konkret observeret en direkte korrelation mellem de målte pesticidkoncentrationer og metanindholdet i grundvandet ved de deltagende vandværker – dvs. mere metan der var til stede i grundvandsboringen, desto mindre sandsynligt var det, at der blev målt høje pesticidkoncentrationer i det indvundne grundvand. Denne observation kunne antyde, at pesticidresterne over tid var omsat mikrobielt (co-metabolsk). Korrelationen kan dog også med stor sandsynlighed skyldes boringernes alder og dybde, da boringer med metanindhold ofte er dybe og knap så forurenede med nedsivede pesticidrester.

Der blev ikke observeret en korrelation mellem pesticidrestkoncentrationen og ammonium-/ammoniakforekomsten i grundvandsboringer ved de deltagende vandværker. Under de testede forhold blev DPC ikke omsat co-metabolsk, når mikroorganismene blev udsat for lave DPC-koncentrationer over en længere tidsperiode, hverken i laboratorie- eller pilotskalafor søg. Det vurderes, at betydningen af co-metabolsk nedbrydning af DMS og DPC ved nitrifikation og metanoxidation er minimal i de deltagende vandværker.

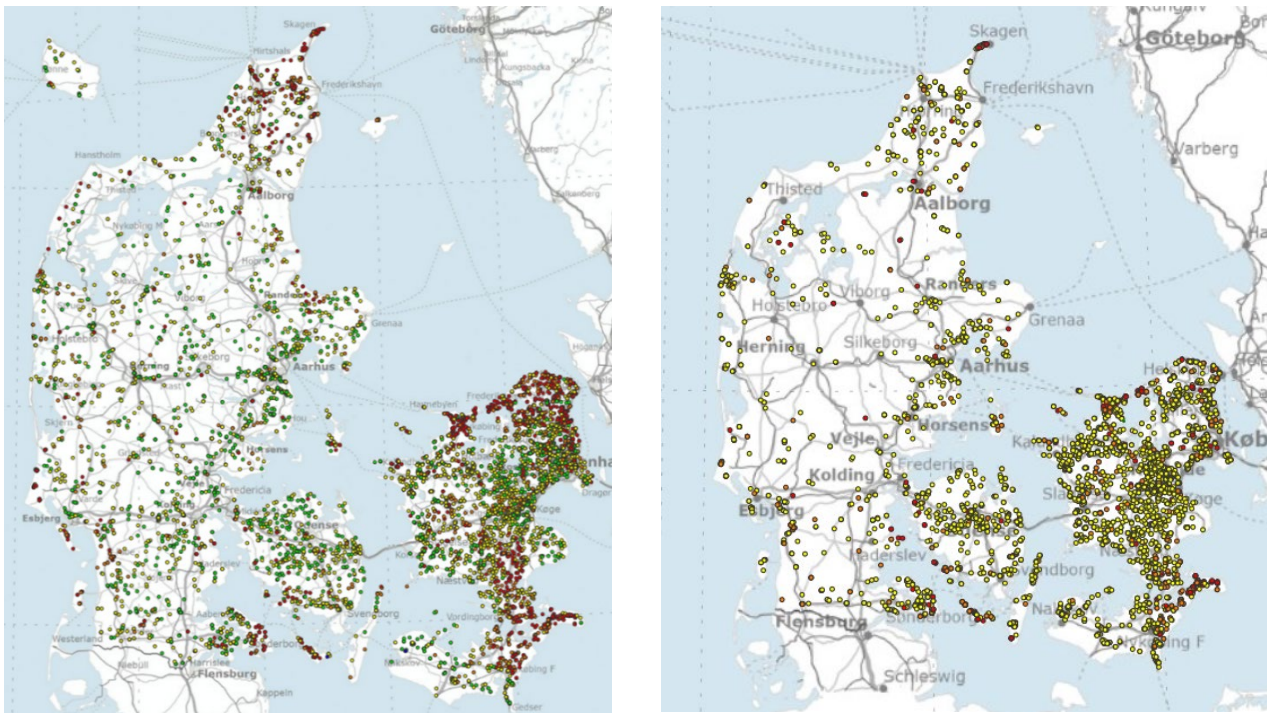
### 5.3 Projektresultater

#### 5.3.1 Introduktion

DMS og DPC blev i 2020 fundet i henholdsvis 29,8 % og 31,5 % af drikkevandsboringerne i Danmark (Figur 1, Geus 2020), hvorfor fjernelse af rester af netop disse pesticider er særligt relevant for mange forsyninger. Da det er veldokumenteret, at mange organiske stoffer kan nedbrydes co-metabolsk af både ammonium- og metanoxiderende mikroorganismer, er det yderst relevant at se på forekomsten af metan og ammonium i grundvandet. Metan og ammonium findes ofte i grundvandet – særligt i Nordjylland og på Sjælland (Figur 1 og Figur 2). Co-metabolsk fjernelse af DMS og DPC vil derfor være relevant for rigtig mange forsyninger – særligt, hvis processen kan stimuleres ved mindre justeringer på vandbehandlingen.



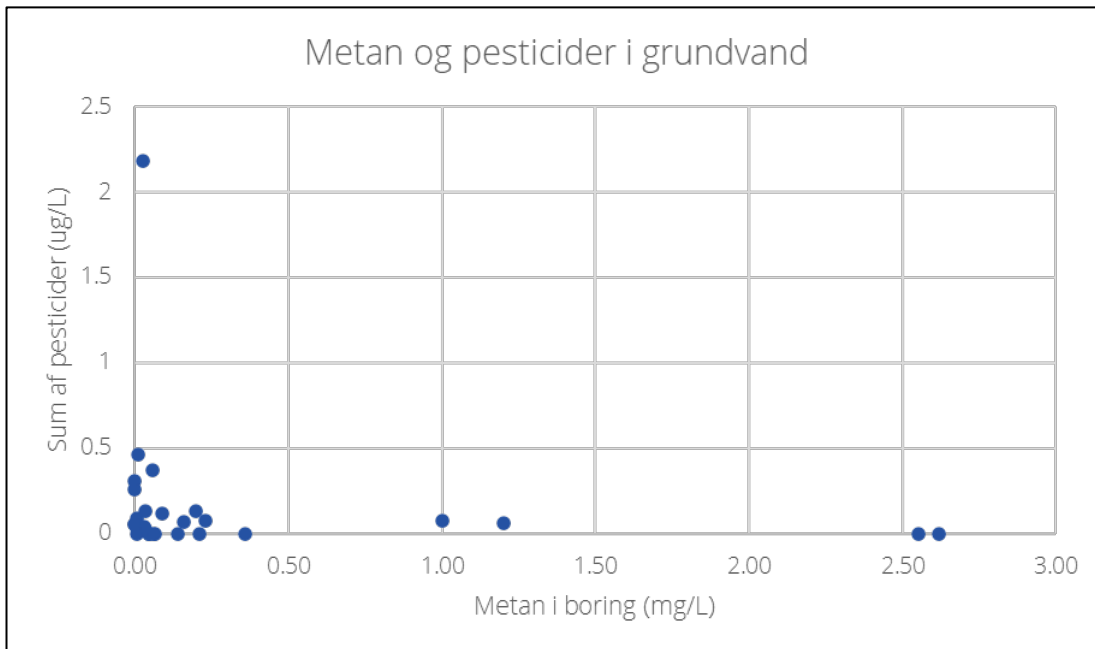
Figur 1 Oversigt over drikkevandsboringer, hvor DMS- og DPC-koncentrationer blev detekteret ved seneste måling. DPC ses til venstre og DMS ses til højre. De røde prikker angiver, at koncentrationen ved seneste måling var over grænseværdien på 0,1 µg/l; orange prikker angiver, at der tidligere har været overskridelser; gule prikker angiver, at DMS er fundet i koncentrationer lavere end grænseværdien (GEUS - datatræk november 2021).



Figur 2. Oversigt over metankoncentrationer (til venstre) og ammoniumkoncentrationer (til højre) i grundvandsboringer. For metankoncentrationerne angiver de røde og orange prikker koncentrationer højere end 0,2 mg/l, de gule og grønne prikker angiver boringer fra 0,2 til 0,01 mg/l. Boringer med lavere værdier er undladt på oversigten. For ammoniumkoncentrationen angiver gule prikker, at indholdet er mellem 0,5 og 1,5 mg/l; orange prikker angiver et indhold mellem 1,5 og 3 mg/l; røde prikker angiver, at indholdet er over 3 mg/l.

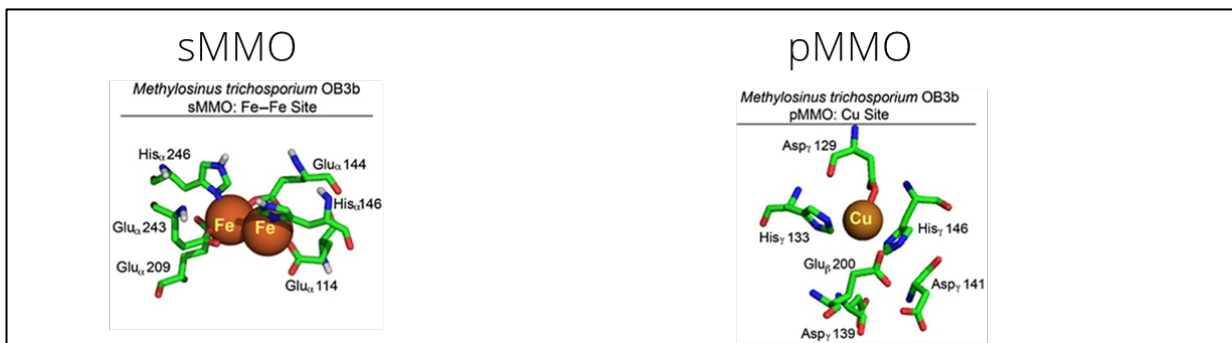
Der er færre drikkevandsboringer med DMS- og DPC-overskridelser i Nordsjælland, hvor metanforekomsten er høj, men det er vanskeligt at vurdere direkte, om der er en sammenhæng mellem metan- og/eller ammonium- og pesticidforekomster i grundvandet ved visuel sammenligning af punkter.

Data for indhold af pesticidrester, ammonium og metan blev indsamlet fra de deltagende forsyninger. Det var igen tydeligt blandt de deltagende vandværker, at der var en korrelation mellem forekomsten af metan i grundvandet og pesticidindholdet – nemlig, jo højere metanindhold, desto lavere pesticidforekomst kunne ses (figur 3). For ammonium ses der ingen korrelation mellem indholdet af ammonium i grundvandet og den tilsvarende pesticidforekomst, se Figur 3.



bakterier kan danne pMMO, hvis de gives de rette forhold (Hanson and Hanson, 1996), mens sMMO kun kan dannes af bestemte MOB'er, nemlig primært dem som tilhører MOB II. Selvom pMMO og sMMO begge oxiderer metan, så er der en række forskelle i proteinstruktur, co-faktorer, substrater og metanoxideringsmekanismer (Park og Kim, 2019). En oversigt over nogle af de væsentlige forskelle fremgår af Figur 5. Det er væsentligt at bemærke, at der indgår henholdsvis jern og kobber i det aktive site, hvilket har relevans, når aktiviteten skal stimuleres.

Det er dokumenteret, at sMMO er den mindst substratspecifikke af de to former, dvs. den oftere oxiderer et andet substrat end metan. Det betyder, at denne form forventes at være mere relevant til nedbrydning af et uspecifikt substrat, co-metabolsk. sMMO findes imidlertid ikke i alle typer af metanoxiderende mikroorganismer, mens pMMO er mere substratspecifik, hvorfor det kan være relevant at undersøge, om kobber kan stimulere pesticidfjernelse. Studiet af Hedegaard et al., 2019 dokumenterede en øget nedbrydning for 4 af de i alt 10 undersøgte pesticider, når reaktoren med den metanogene berigelse blev sultet for metan.



Figur 5 Oversigt over egenskaberne ved enzymerne sMMO og pMMO, der oxiderer metan. sMMO findes primært i MOB II og fungerer bedst ved lave koncentrationer, hvorimod pMMO findes i både MOB I+II og bedst fungerer ved høje koncentrationer.

### 5.3.3 Stimulering af ammoniumoxidation

Nitrifikanter findes både i drikkevandssandfiltre og i spildevandssystemer, hvor bakterierne omsætter ammonium til nitrat. Som oftest sker dette via en 2-trins proces med først ammoniumoxiderende bakterier (AOB) og efterfølgende med nitritoxiderende bakterier (NOB); dog er visse arter (comammox) for nylig identificeret til at kunne oxidere ammonium hele vejen til nitrat (Daims et al., 2015). Nitrifikanter kan naturligvis stimuleres af ammonium og ilt, som er de 2 primære substrater i processen. Nitrifikanter er autotrofe og bruger CO<sub>2</sub> som C-kilde, og mikroorganismer, som anvender CO<sub>2</sub>, kan ofte være kulstofbegrænsede (Dagley and Hinshelwood, 1938; Green et al., 2002; Denecke and Liebig, 2003). Nitrifikationsrater stimuleres også af flygtige organiske stoffer i drikkevand (Mohanty et al., 2019; Tang et al., 2017). I forbindelse med bakteriel fjernelse af lægemidler fra udløbsvand fra renseanlæg, blev en positiv korrelation med andelen af nitrifikanter og fjernelse af visse lægemidler identificeret (Tang et al., 2017). En effektiv stimulering heraf var mulig gennem regimer med skiftevis tilførsel af mindre mængder af råspildevand efterfulgt af perioder med sult (ingen tilførsel). Dette feast-starve-regime blev anvendt med succes ift. fjernelse af visse lægemidler (dog ikke alle typer af lægemidler) vha. mikrobiologisk efterpolering af udløbsvand fra renseanlæg (Tang et al., 2020).

Let tilgængelighed af co-faktorer i enzymer kan også virke stimulerende for processen, hvilket primært er begrænsende i drikkevandssystemer. Der er adskillige studier, som viser, at kobber kan stimulere nitrifikationen. Kobber er en co-faktor i

ammoniummonooxygenasen, som er det essentielle enzym for ammoniumoxidationen. Kobbermangel er almindelig i et næringsfattigt miljø såsom grundvand, hvilket har ført til, at kobber i nogle tilfælde tilføres sandfiltre ved anvendelse af en kobberstav eller -plade. Lave kobberkoncentrationer er tilstrækkeligt til at stimulere nitrifikationen. Ved tilførsel af 5 µg Cu/L stimuleres nitrifikation straks, og nitrifikationsraten blev fordoblet på 20 dage (Wagner et al., 2016). Senere er det ligeledes blevet påvist, at mindre tilførsel af kobber (1 µg Cu/L) kan stimulere nitrifikationen til samme niveau som ved 5 µg Cu/L (Wagner et al., 2019).

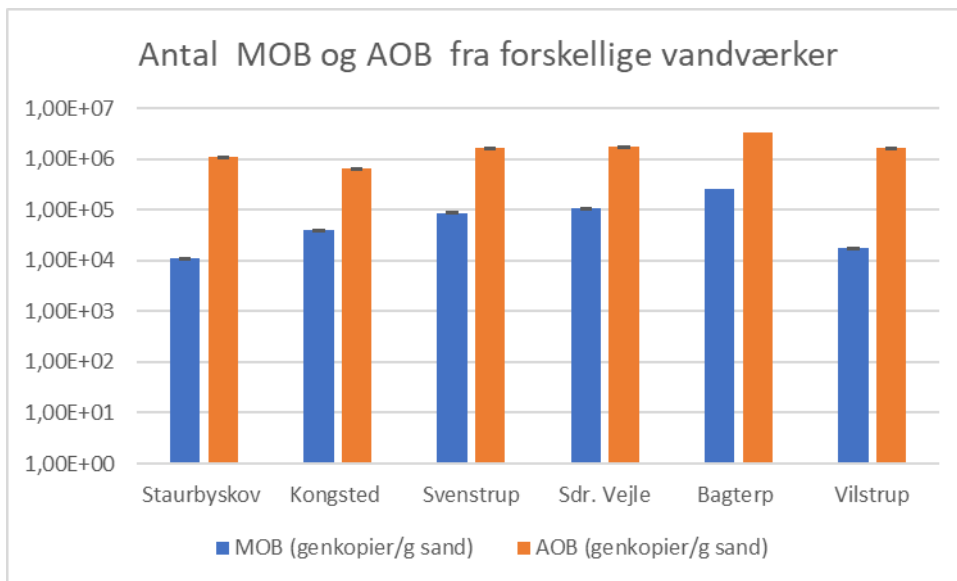
Endelig er det vigtigt at være opmærksom på pH-forholdene. Hvis forholdene bliver sure (under pH 6,8) eller basiske (over pH 8,5), så inhiberes nitrifikanterne – det vurderes, at drikkevand typisk vil være indenfor dette pH-interval.

### 5.3.4 Mikrokosmosforsøg i laboratorieskala

Formålet med dette laboratoriesetup var at booste metan- og ammoniumoxidationsraten gennem simple manipuleringer. Vandprøver fra forskellige vandværker blev undersøgt for metan og ammonium, se Tabel 1. På baggrund af målingerne blev sandprøver fra samme vandværker desuden analyseret for tilstedeværelsen af hhv. nitrifikanter og metanoxiderende bakterier vha. qPCR.

Tabel 1 Overblik over metan- og ammoniumindhold ved undersøgte borer.

| Vandværk      | Metankoncentration mg/l | Ammoniumkoncentration mg/l |
|---------------|-------------------------|----------------------------|
| Stauerby Skov | 0,04                    | 0,72                       |
| Kongsted      | 0,16                    | 0,21                       |
| Svenstrup     | 0,57                    | 0,66                       |
| Sønder Vejle  | 0,04                    | 0,35                       |
| Bagterp       | Nd                      | 0,08                       |
| Vilstrup      | 0,02                    | 0,27                       |



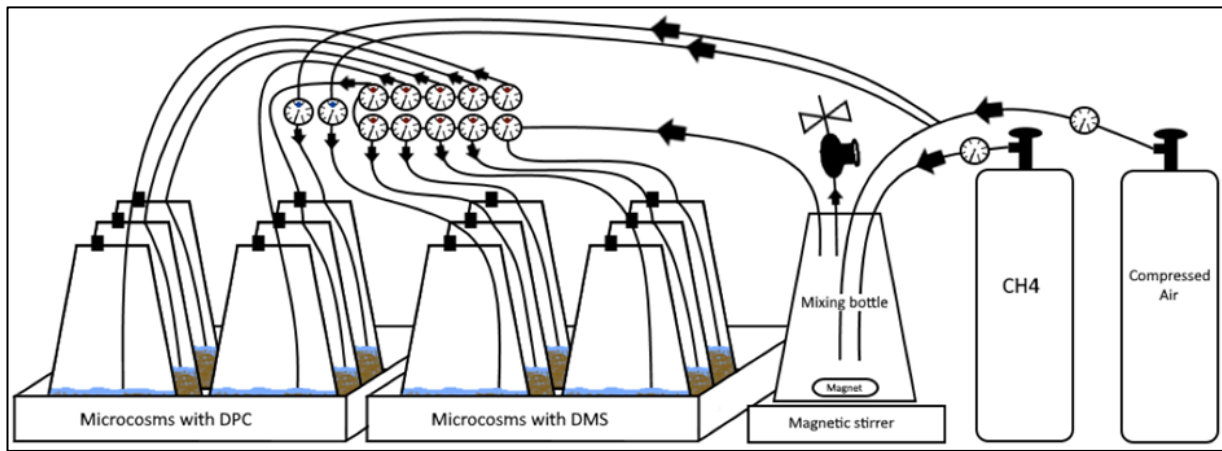
Figur 6 Overblik over antal MOB (metanoxiderende bakterier) og AOB (ammoniumoxiderende bakterier) i sandprøver fra udvalgte vandværker. Y-aksen repræsenterer total antal genkopier per gram sand (bemærk log skala).

Som det fremgår af Figur 6, så finder der MOBér og AOBér i alle undersøgte sandprøver, dog forefindes der en del flere AOBér. Dvs. at der er potentiale i sandfiltrene til at kunne fremme en cometabolsk pesticidfjernelse, da bakterierne er til stede. På baggrund af disse data blev der anvendt sand fra hhv. Bagterp og Vilstrup vandværker til de efterfølgende kolonneforsøg for at fremme hhv. MOBér og AOBér.

### 5.3.5 Mikrokosmosforsøg med metanstimulering af co-metabolsk aktivitet

Initiale forsøg uden mikrobiel aktivitet, men med tilsat autoklaveret sand viste ingen omsætning af metan eller produktion af CO<sub>2</sub> (data ikke vist).

Som beskrevet ovenfor, blev sandprøver fra Bagterp Vandværk brugt til at gennemføre kolonneforsøg, og det eksperimentelle setup er vist i Figur 7. Der blev anvendt 100 g sand og 100 ml vand. Metan og luft blev blandet inden tilledning til mikrokosmosforsøgene, svarende til 0,03 mg/l metan.



Figur 7. Overblik over metanstimuleringsforsøg gennemført i laboratorieskala.

I kolonneforsøgene blev der tilsat forskellige mængder af hhv. kobber (høj og lav) og ammonium (høj og lav) for at undersøge, om tilsætningen af disse stoffer, i kombination med metan, ville fremme nedbrydningen af DMS og DPC, se Tabel 2.

Tabel 2. Oversigt over tilsat mængde pesticider, kobber og ammonium til kolonneforsøg.

| Condition                        | Pesticid tilsat | Metan tilsat | Kobber tilsat [mg/L] | Ammonium tilsat [mg/L] |
|----------------------------------|-----------------|--------------|----------------------|------------------------|
| <b>Kontrol uden metan</b>        | DMS             | -            | 0                    | 0                      |
| <b>Kontrol med metan_1</b>       | DMS             | X            | 0                    | 0                      |
| <b>Kontrol med metan_2</b>       | DMS             | X            | 0                    | 0                      |
| <b>Lav kobberkoncentration_1</b> | DMS             | X            | 0,006                | 0                      |
| <b>Lav kobberkoncentration_2</b> | DMS             | X            | 0,006                | 0                      |
| <b>Lav ammoniumkoncentration</b> | DMS             | X            | 0                    | 2                      |
| <b>Kontrol uden metan</b>        | DPC             | -            | 0                    | 0                      |
| <b>Kontrol med metan_1</b>       | DPC             | X            | 0                    | 0                      |
| <b>Kontrol med metan_2</b>       | DPC             | X            | 0                    | 0                      |
| <b>Lav kobberkoncentration_1</b> | DPC             | X            | 0,006                | 0                      |
| <b>Lav kobberkoncentration_2</b> | DPC             | X            | 0,006                | 0                      |
| <b>Lav ammoniumkoncentration</b> | DPC             | X            | 0                    | 2                      |

Resultaterne, som blev opnået efter 28 timers inkubation, fremgår af Tabel 3.

Tabel 3. Overblik over forsøg med DMS- og DPC-reduktioner i kolonneforsøg med og uden tilsætning af kobber og ammonium.

| Pesticid tilsat | Prøve                     | Initiel pesticidkoncentration [µg/L] | Slutkoncentration af pesticid [µg/L] |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| DMS             | Kontrol uden metan        | 0,65                                 | 0,46                                 |
|                 | Kontrol med metan 1       | 0,65                                 | 0,46                                 |
|                 | kontrol med metan 2       | 0,65                                 | 0,46                                 |
|                 | Lav kobberkoncentration 1 | 0,65                                 | 0,23                                 |
|                 | Lav kobberkoncentration 2 | 0,65                                 | *                                    |
|                 | Lav ammoniumkoncentration | 0,65                                 | *                                    |
| DPC             | Kontrol uden metan        | 0,78                                 | 0,008                                |
|                 | Kontrol med metan 1       | 0,78                                 | 0,012                                |
|                 | kontrol med metan 2       | 0,78                                 | 0,013                                |
|                 | Lav kobberkoncentration 1 | 0,78                                 | 0,014                                |
|                 | Lav kobberkoncentration 2 | 0,78                                 | 0,010                                |
|                 | Lav ammoniumkoncentration | 0,78                                 | < 0,003                              |

\*Inkonklusiv, da den målte pesticidkoncentration var højere end den tilsatte koncentration.

Kolonneforsøg viste adsorption af både DMS og DPC i kontrolforsøgene. Metanoxideringsraten blev ikke forøget ved tilsætning af kobber eller ammonium ved nogen af de testede koncentrationer. Baseret på resultaterne blev det skønnet, at et betydeligt, mikrobiologisk DMS-nedbrydningspotentiale og et mindre DPC-nedbrydningspotentiale kunne findes i sandfiltrene. Tilsætning af metan så ikke ud til at kunne øge nedbrydningen af DPC nævneværdigt, mens tilsætning af ammonium resulterede i lavere udløbskoncentrationer af DPC, hvorfor et potentiale for en mindre co-metabolsk nedbrydning vha. AMO-enzymene, blev observeret. Forsøgene viste, at tilsætning af lav kobberkoncentration øgede nedbrydningen af DMS, men 2 af de indsendte prøver med kobber og ammonium gik desværre tabt.

Resultaterne for mikrobiel nedbrydning af DPC blev dokumenteret, men tilstedeværelsen af metan alene var ikke nok til at fremme en yderligere nedbrydning. Der var visse indikationer af, at tilsætning af ammonium havde en positiv indvirkning på nedbrydning af DPC. En udfordring ved disse forsøg var inkubationernes længde på 28 timer under dosering af pesticid. Årsagen til dette er, at analyseomkostningerne er relativt store. De 28 timer vurderes dog som værende tidsmæssigt begrænsende ift. at opnå en populationstilvækst af enten AOB eller MOB som følge af stimulering. En relativ stor fjernelse af pesticidresterne observeres, hvilket formodes at skyldes adsorption til sandet i kolonnerne.

### 5.3.6 Mikrokosmosforsøg med ammoniumstimulering

I laboratoriet blev der udført 2 forsøg med henblik på at stimulere nitrifikanter til co-metabolsk at omsætte DPC baseret på de tidligere resultater. Stimuleringsforsøgene blev

udført med koncentrationer, der ligger indenfor de normalt observerede koncentrationer i drikkevand i Danmark (udvalgte værdier ses i Tabel 4)

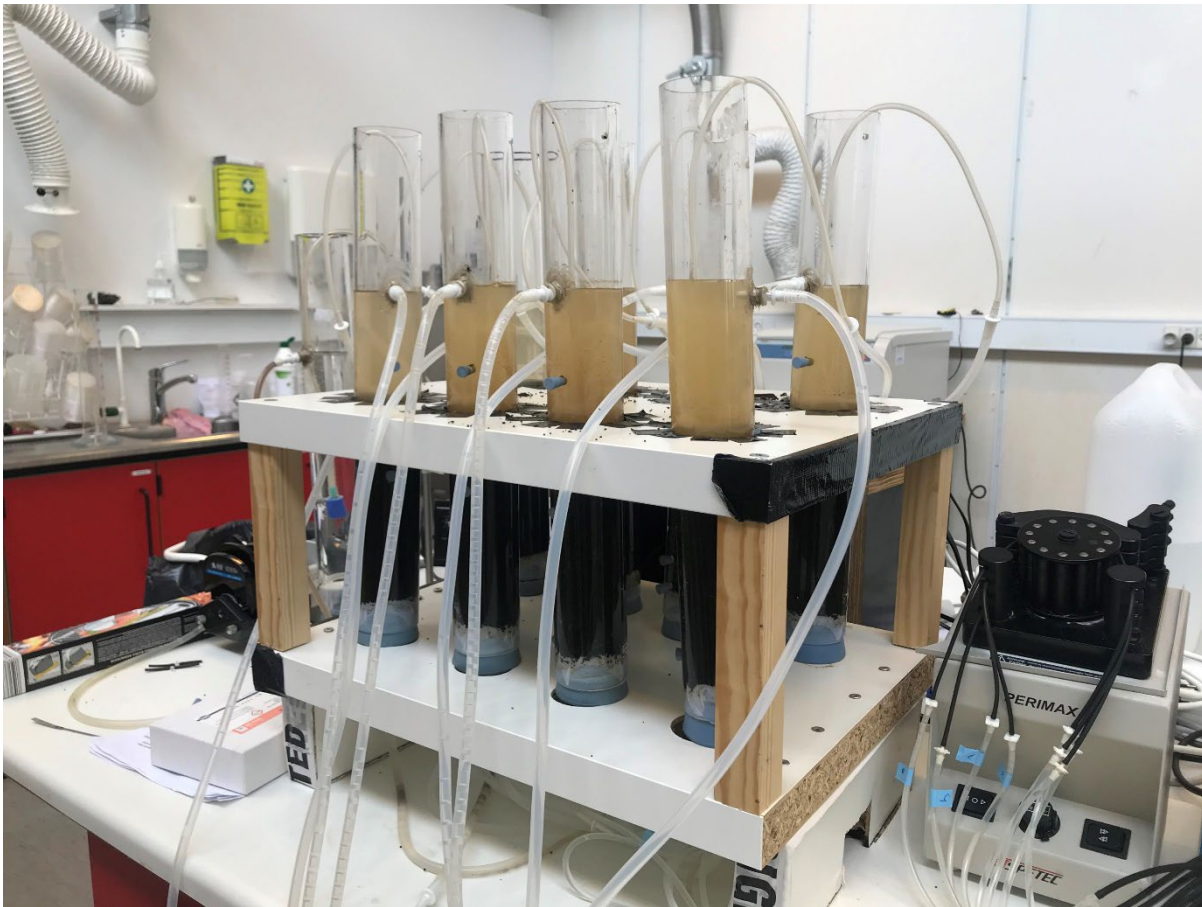
Tabel 4. Overblik over ammoniumkoncentrationer i danske vandværksprøver.

| Stof                       | Koncentration i råvand |
|----------------------------|------------------------|
| Ammonium DK maximale værdi | 3,2 mg/l               |
| Ammonium DK ca. gns        | 0,3 mg/l               |
| Ammonium Vilstrup          | 0,12 – 0,82 mg/l       |
| Kobber gns.                | 1,1 µg/l               |

I det første kolonneforsøg blev hver kolonne tilført sand fra Vilstrup Vandværk. Kolonnerne blev hver tilsat 700 g sand og kontinuert tilført hanevand (1,9 L/døgn) tilsat ammonium og kobber i forskellige koncentrationer (Tabel 5 og Figur 8). Stimuleringen blev udført med duplikatkolonner og forløb over i 122 dage. Undervejs blev der 3 gange tilsat 40 ml nitrifikationsbuffer (5,04 g/L NaHOC<sub>3</sub> og 2,65 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) til hver kolonne, og iltforbrugsraten blev målt som indirekte mål for, om der var forskellige nitrifikationsrater i kolonnerne (HACK Lange HQ40D iltmåler). Yderligere blev der gennemført 2 ekstra forsøg med tilsætning af nitrifikationsbuffer (20 ml) og udført målinger på udløbskoncentration for ammonium, nitrit og nitrat (målt med teststrips). Ved forsøgets afslutning blev der tilført DPC (0,5 µg/L) til vandforsyningen til kontrolkolonnerne og til kolonnerne tilsat ammonium, idet den største effekt af stimuleringen blev observeret her. DPC-koncentrationen i udløbsvandet i de 4 kolonner blev målt efter 12 timer og efter 4 dage.

Tabel 5. Overblik over ammonium- og kobberkoncentrationer tilsat kolonnerne.

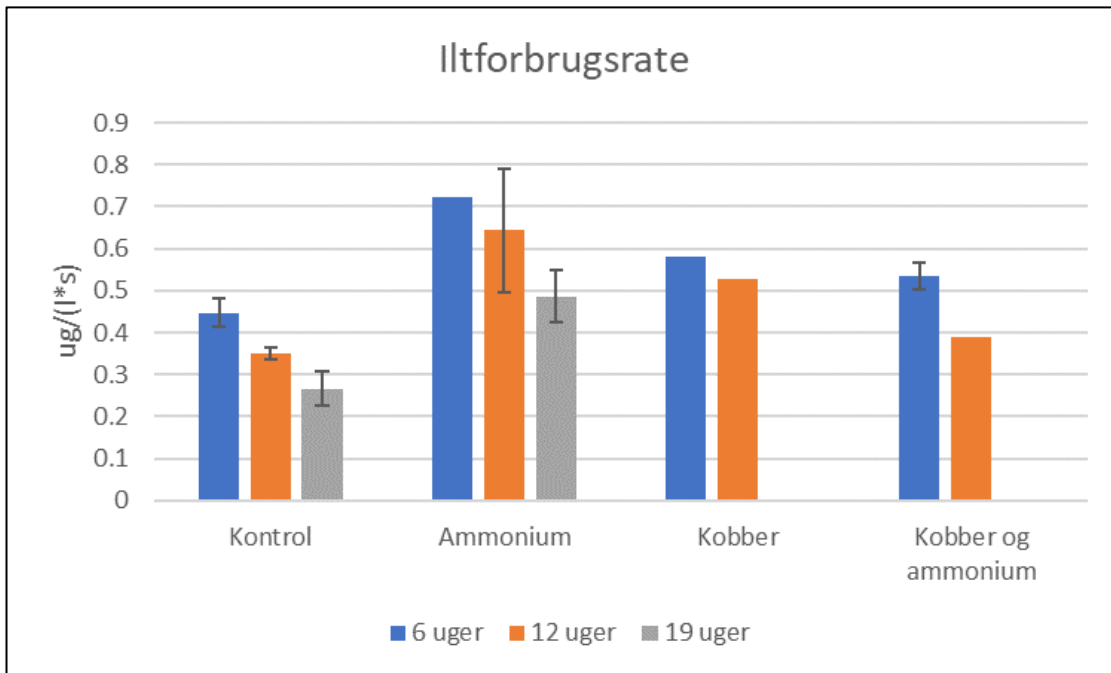
|          | Kontrol  | Ammonium | Kobber   | Ammonium + kobber |
|----------|----------|----------|----------|-------------------|
| Ammonium | 0,3 mg/l | 2,6 mg/l | 0,3 mg/l | 0,6 mg/l          |
| Kobber   | 1,1 µg/l | 1,1 µg/l | 6 µg/l   | 6 µg/l            |



Figur 8. Oversigt over kolonneopstilling til stimulering af nitrifikanter.

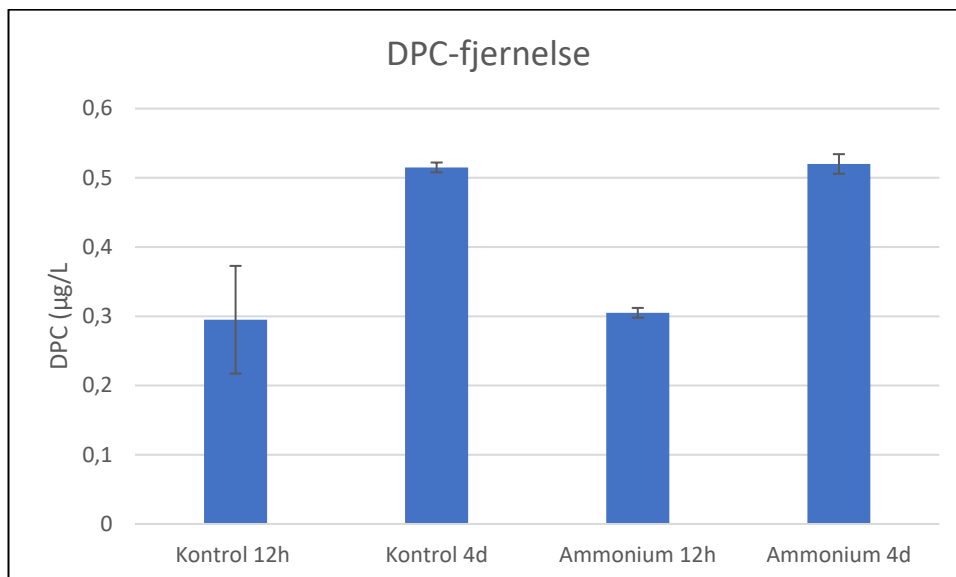
Nitrifikation af ammonium til nitrat består typisk af 2 trin udført af 2 forskellige grupper af mikroorganismer; en gruppe, der oxiderer ammonium til nitrit, og en gruppe, der oxiderer nitrit til nitrat. Der blev kun målt nitrat i udløbet, hvilket betyder, at det mikrobielle samfund enten er begrænset af hastigheden for ammoniumoxidation, eller at der er comammoxbakterier til stede i kolonnerne, som selv omsætter ammonium direkte til nitrat.

Det blev observeret, at ilt forbruges hurtigere i de kolonner, der kontinuert tilføres 2,6 mg/L ammonium, hvilket indikerer, at der er højere aktivitet af nitrifikation og dermed nitrifikanter i disse kolonner, se Figur 9. Iltforbruget blev stimuleret af hhv. høj kobbertilsætning alene eller sammen med ammonium og i kolonner med høj tilsætning af ammonium. I hver enkelt kolonne falder aktiviteten i løbet af forsøgsperioden. Aktivitetsfaldet kan enten skyldes, at mikroorganismene er begrænsede af manglen på mikronæringsstoffer, som de ikke forsynes med i hanevand, eller at temperaturen i lokalet er faldet markant i løbet af forsøgsperioden (fra efterår til vinter).



Figur 9. Gennemsnitlig iltforbrugsrate i de eksperimentelle kolonner med og uden ekstra tilsætning.

For at undersøge, om stimuleringen af nitrifikationen også ville resultere i en øget DPC-fjernelse, blev der tilsat DPC til indløbsvandet (0,5 ug/L) til kontrollerne og til de ammoniumstimulerede kolonner. Efter 12 timer var DPC-koncentrationen faldet med 40 % (fra 0,5 ug/L til 0,3 ug/L) i både kontrollerne og de ammoniumstimulerede kolonner, men efter 4 dage var udløbskoncentrationen lig indløbskoncentrationen (0,5 ug/L), Figur 10.

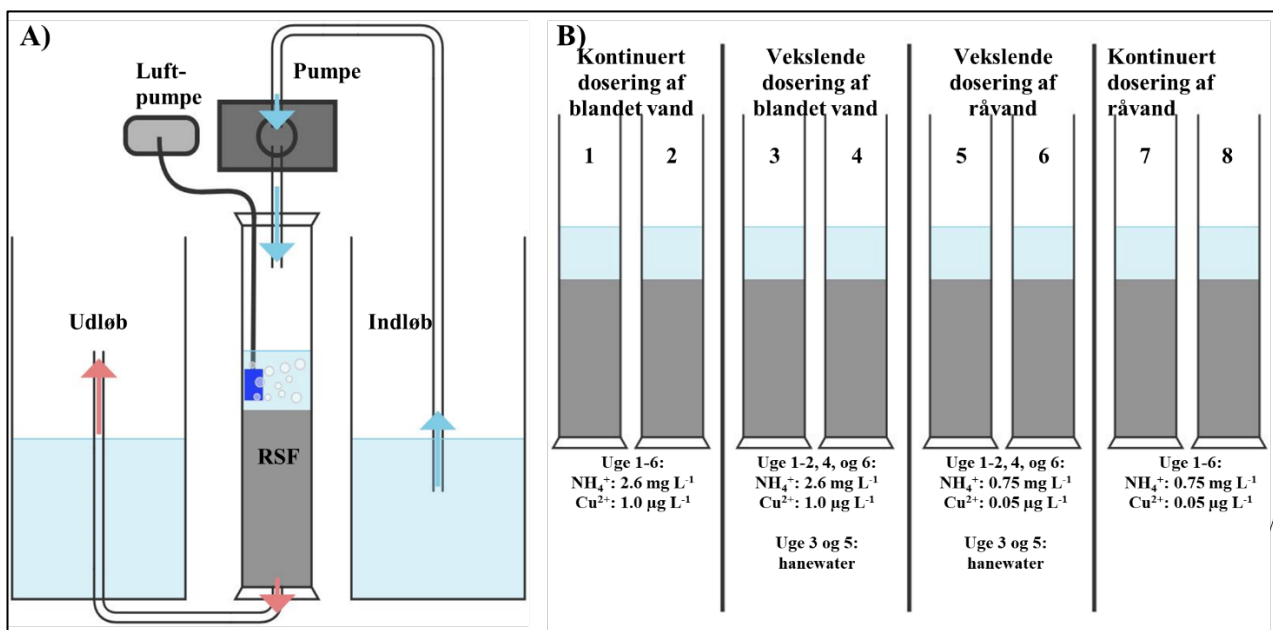


Figur 10. Overblik over DPC-reduktion efter hhv. 12 timer og 4 dage.

Den observerede fjernelse af DPC i kontrolkolonner (abiotiske) efter 12 timer er antagelig sket pga. den kemiske DPC-adsorption til sandet, som også blev observeret tidligere. Det samme fald observeres i biologisk aktive ammoniumstimulerede kolonner, som også må tilskrives den kemiske adsorption og ikke nitrifikationen heri.

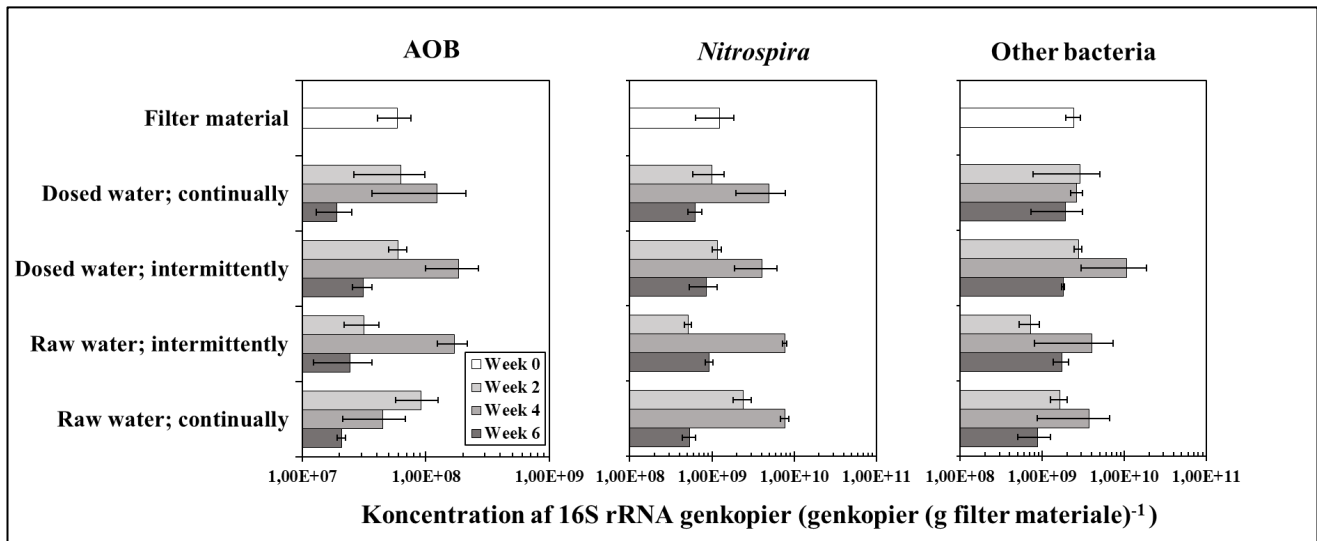
Resultaterne viste endvidere, at DPC-koncentrationen i ind- og udløbsvand var ens efter 4 dage (0,5 ug/L), og der var således ingen fjernelse af DPC i kolonnerne. Den manglende reduktion efter 4 dage i kolonnerne kunne muligvis skyldes, at DPC binder irreversibelt til AMO-enzymet, der udfører ammoniumoxidation – om end dette anses for at være mindre sandsynligt. Det må derfor konkluderes, at en stabil forsyning af ammonium og kobber ikke er tilstrækkeligt til at booste den co-metabolske DPC-nedbrydning ved nitrifikation i laboratorieskala, under antagelse at pesticidresten kan nedbrydes co-metabolsk.

I forbindelse med et bachelorprojekt blev der initieret et ekstra nitrifikationsforsøg med sand fra TREFOR (fra Staurby Skov Vandværk) for at undersøge mulig stimulering af co-metabolsk nedbrydning af DPC. Der blev afprøvet feast-starve-regimer, hvor tilgængeligheden af ammonium og kobber varierer, se Figur 11



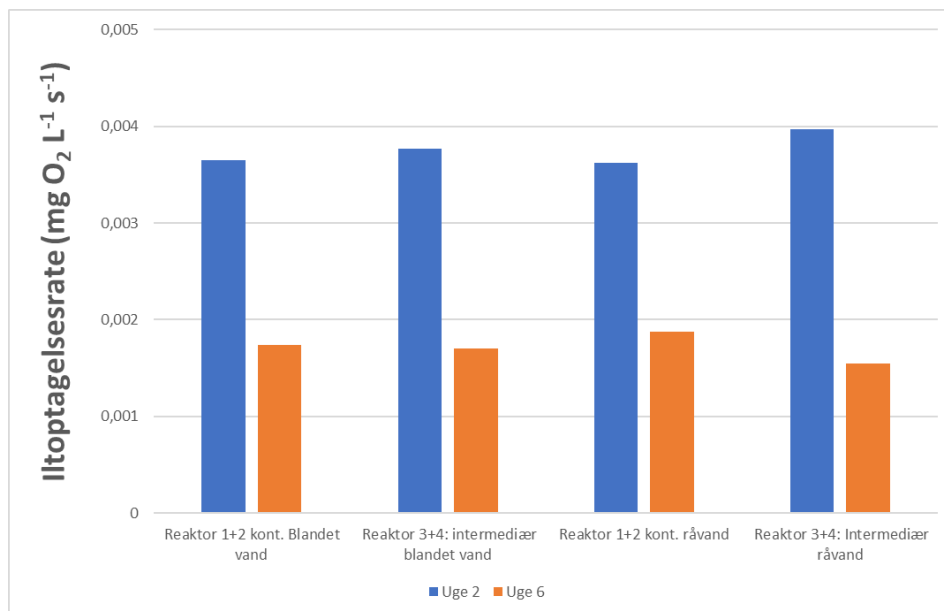
Figur 11. Oversigt over forsøgssetup til stimulering af co-metabolsk nedbrydning af DPC gennem vekslende tilførsel af stimulanter (ammonium og kobber).

Den bakteriologiske sammensætning i kolonnerne blev under forsøgene målt vha. qPCR, se Figur 12. Som det fremgår, øges antallet af AOB og NOB fra forsøgets start til uge 4, men antallet af totalbakterier forbliver det samme uafhængigt af kolonnekonfiguration. Mellem uge 4 og uge 6 sker der et fald i mængden af AOB og NOB. Standardafvigelsen på antal totalbakterier muliggør ikke en differentiering, hvilket antyder, at den samlede bakteriepopulation holdes konstant.



Figur 12. Overblik over mikrobiel sammensætning af AOB, NOB og andre bakterier i forsøgsperioden.

Målingerne angiver dog ikke aktivitet, og for således at få et mål for aktiviteten i reaktorerne, blev iltoptagelsesraterne målt, se Figur 13. Som det fremgår, er iltforbruget stort set det samme i de forskellige kolonner både i uge 2 og i uge 6. For alle reaktorer gælder det, at iltforbruget falder markant i uge 6. Variationerne mellem kolonnerne er dog så små, at der ikke kan skelnes mellem vandtype eller kontinuert versus intermedieær tilførsel (data ikke vist).



Figur 13. Aktivitetsmål for kolonnesetup, målt som iltforbrug.

Som det fremgår af Tabel 6, tilledes der blandet vand eller råvand, kontinuert eller intermedieært. Intermedieær tilførsel indikerer perioder uden den tilledte vandtype, men med tilledning af hanevand, dvs. en sulteperiode. Der observeres ingen signifikant fjernelse af DPC under inkubationsperioden, da de målte udløbsværdier fra kolonnerne falder inden for

analysesikkerhederne (30 %). I flere tilfælde observeres en højere koncentration i udløbet fra reaktorerne end doseret i indløbet, som her er angivet som positiv procentsats, hvorimod lavere koncentrationer angives med en negativ procentsats.

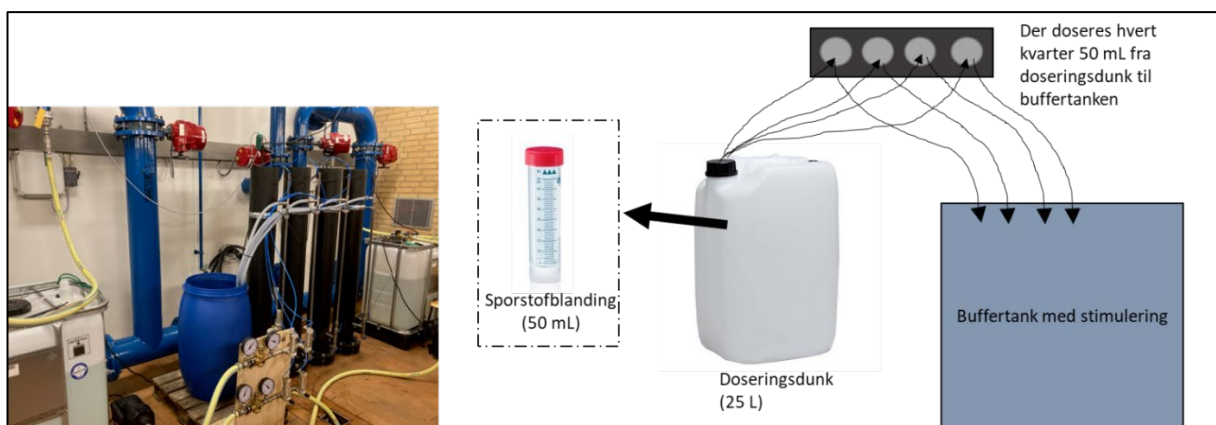
Tabel 6. Overblik over DPC-fjernelse i kolonner indikeret i procenter (%) med hhv. blandet vand og råvand, indfødt kontinuert eller intermediært med sulteperioder.

|                              | DPC-koncentration (ng/l) |              |             |
|------------------------------|--------------------------|--------------|-------------|
|                              | Uge 2                    | Uge 4        | Uge 6       |
| <b>Blandet vand (indløb)</b> |                          |              |             |
| Kontinuert (udløb)           | 5 % ± 5 %                | 15 % ± 2 %   | -5 % ± 4 %  |
| Intermediær (udløb)          | 9 % ± 3 %                | 12 % ± 4 % * | 1% *        |
| <b>Råvand (indløb)</b>       |                          |              |             |
| Kontinuert (udløb)           | 4 % ± 4 %                | -            | -10 % ± 3 % |
| Intermediær (udløb)          | 0 % ± 3 %                | - *          | -3 %        |

\* Hanevand tilføres

### 5.3.7 Stimulering af nitrifikation og co-metabolisk fjernelse af DPC i pilotskalasandfiltre ved Verdo

Det blev besluttet at undersøge, om kobber og ammonium kan fremme den co-metaboliske nedbrydning af DPC i et sandfilter. Der tilsættes ammoniumsulfat svarende til ca. 1 mg/L i indløb, og tilsvarende tilsættes kobberkloridopløsning svarende til ca. 1-1,4 µg/L i indløb. Forsøget forløb over 125 dage.

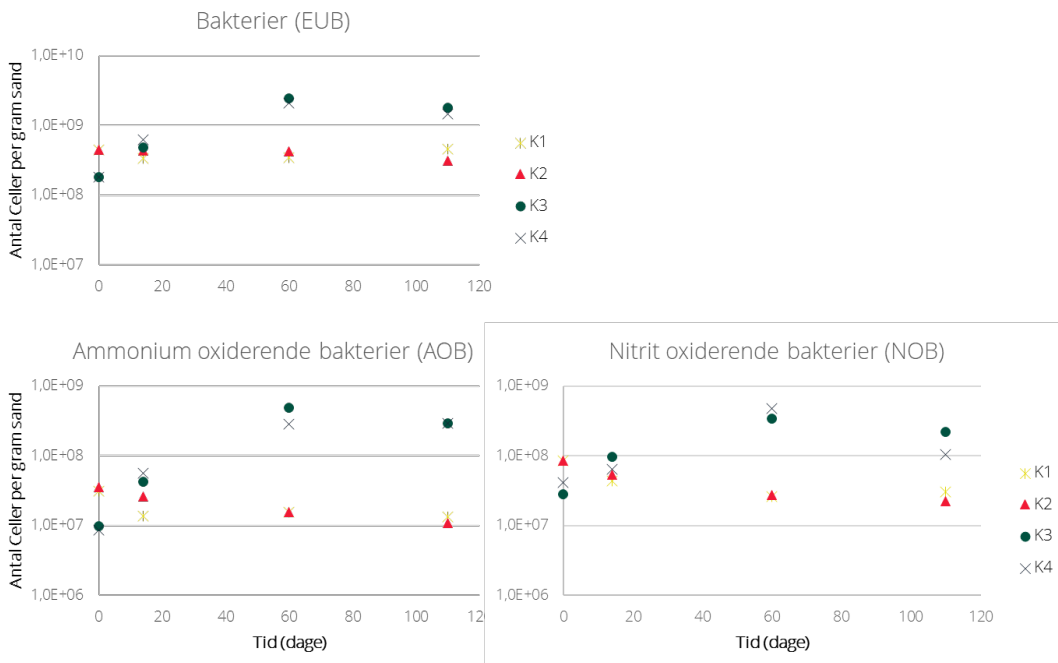


Figur 14. Overblik over pilotskalaopstillingen ved Verdo.

Som det fremgår af Figur 14, blev der opsat i alt 4 kolonner. Kolonne 1+2 fungerede som kontroller og fik således kun tilført forfiltreret vand fra Vilstrup Vandværk for at undgå udfordringer med jernudfældning, hvorimod de 2 øvrige stimulerede kolonner fik tilført efterfiltreret vand tilsat en sporstofblanding. Vand fra eksisterende sandfilter på vandværket

blev overført til kolonnerne. Kolonner blev kontinuert tilført vand (efter justeringer den første måned blev hver kolonne de resterende måneder tilført ca. 72 l/h).

Der blev periodisk udtaget sandprøver til kvantificering af totalantal bakterier, nitrit- og ammoniumoxiderende bakterier, hhv. 14, 60 og 110 dage efter at stimuleringen blev påbegyndt. På samme tidspunkt blev der udtaget vandprøver til analyse af DPC-indhold. Det totale antal af bakterier samt de nitrit- og ammoniumoxiderende bakterier viste sig at være forskellige i de stimulerede kolonner vs. kontrolkolonnerne (ca. faktor 2,5 for totale bakterier og NOB'er og faktor 3,6 for AOB'er), se Figur 15. Som det fremgår af Figur 15, stiger det totale antal bakterier, nitrit- og ammoniumoxiderende bakterier i de stimulerede kolonner K3 og K4 over tid (5-20 % ift. start). På samme tid falder totalantal bakterier samt antallet af nitrit- og ammoniumoxiderende bakterier i kontrollerne over tid (7-35 % ift. start-antal).



Figur 15. Andel af totalbakterier, ammonium- og nitritoxiderende bakterier under stimuleringsforsøg for kontroller (K1+K2) og stimulerede reaktorer (K3+K4).

DPC-koncentrationen i vandet blev, som det fremgår af Tabel 7, ikke reduceret igennem kolonnerne (heller ikke som følge af adsorption), selvom både det totale antal af bakterier og andelen af nitrifikanter steg i stimuleringsbehandlingerne.

Tabel 7. Overblik over koncentrationen af DPC i hhv. Indløb, udløb kontrolkolonner og udløb stimuleringskolonner.

| Koncentration | Indløb<br>µg/l | Udløb fra<br>Kontrol 1<br>µg/l | Udløb fra<br>Kontrol 2<br>µg/l | Udløb fra<br>Stimulering 3<br>µg/l | Udløb fra<br>Stimulering 4<br>µg/l |
|---------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 14 dage       | 0,038          | 0,041                          | 0,043                          | 0,041                              | 0,041                              |
| 60 dage       | 0,055          | 0,058                          | 0,054                          | 0,066                              | 0,061                              |
| 110 dage      | 0,056          | 0,069                          | 0,055                          | 0,057                              | 0,065                              |

### 5.3.8 Pilotskalastimulering af metanoxidation og co-metabolsk fjernelse ved Hjørring Vand

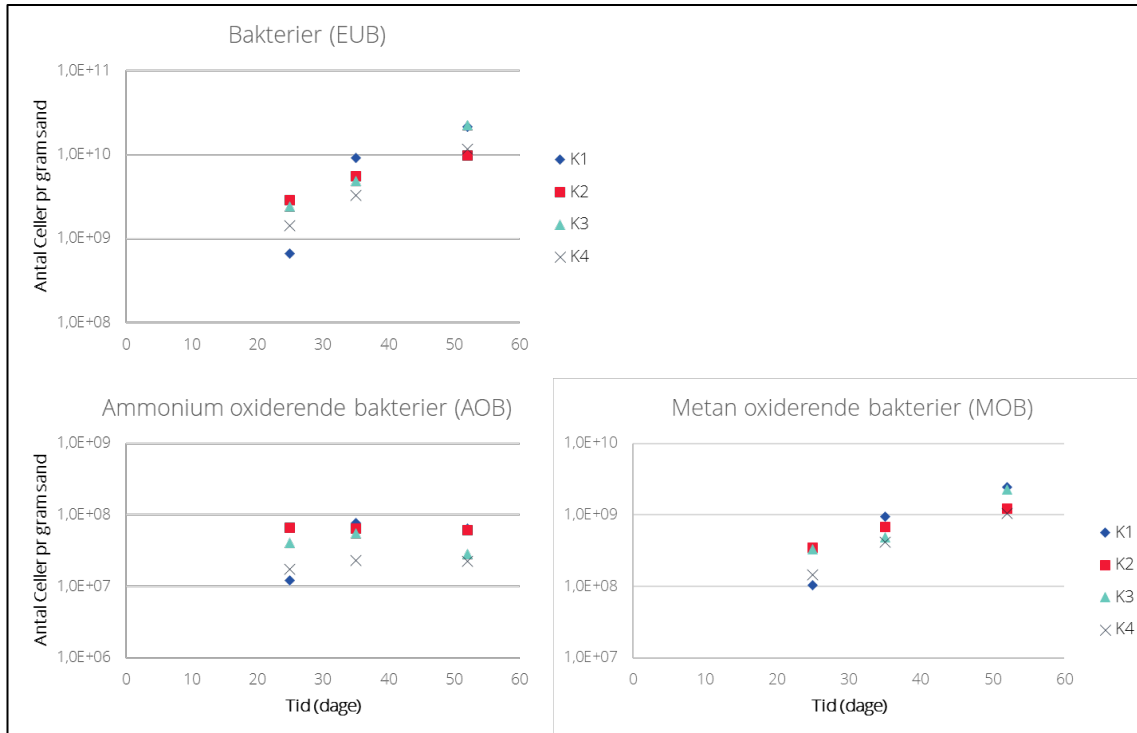
I forbindelse med pilotskalaforsegene opstillet hos Hjørring Vand, blev det undersøgt, om den co-metabolske pesticidfjernelse kunne stimuleres hos de naturlige mikrober i sandfiltrene ved en betydelig tilstedeværelse af metan. Det var her en udfordring, at opløst metan og kuldioxid blev strippet ved iltning i iltningstrapper i det første trin af behandlingen af grundvandet på vandværket. Iltningen er imidlertid et nødvendigt trin, for at give de metan- og ammoniumoxiderende mikroorganismer ilt til oxidationsprocessen. Det er estimeret, at omtrent 95 % af det indvundne metan stripes væk fra grundvandet ved beluftning af vandet.



Figur 16. Overblik over pilotskalaopstillingen ved Hjørring Vand.

I forbindelse med pilotskalaforsegene blev der opstillet en container (Figur 16) direkte ved en boring, hvor der foretages afværgepumpning, og hvor metan er til stede. Kolonnerne blev modificeret, så der blev tilført ilt via en kompressor i bunden af kolonnerne og yderligere igen efter 14 dage, for at sikre forsyningen af metan. Denne blev etableret ved at opstille en gasflaske, og metan blev iblandet luftstrømmen. En koncentration af metan på 0,669 mg/L, blev tilstræbt under hele forsøget. I forsøget blev der opstillet 2 kolonner uden yderligere stimulering med metan (primært SMMO) (K1, K2, Figur 17) og 2 kolonner

med tilsætning af både metan og 1 µg/L kobber (stimulering af MOB'er med pMMO). (K3, K4, Figur 17).



Figur 17. Andel af totalbakterier, ammonium- og nitritoxiderende bakterier under stimuleringsforsøg for kontrol (K1+K2) og stimulerede reaktorer (K3+K4).

Der blev udtaget prøver fra forsøgskolonnerne, hvor antallet af hhv. totalantal bakterier, ammoniumoxiderende bakterier og metanoxiderende bakterier blev bestemt vha. qPCR. Som det fremgår af Figur 17, stiger antal af totalbakterier og antal af metanoxiderende bakterier i løbet af forsøgsperioden på ca. 50 dage. En yderligere stimulering af kolonner med kobber viser ingen signifikant effekt på antal af metanoxiderende bakterier i kolonnerne. Samtidig forbliver antallet af ammoniumoxiderende bakterier konstant i alle kolonner (med undtagelse af K1-kolonne), hvilket er forventeligt, da ammoniumkoncentrationen ikke blev ændret i forsøget.

Som det fremgår af Tabel 8, observeres der en mindre fjernelse af DMS ved dag 25 i 3 ud af 4 kolonner, men denne effekt kunne ikke eftervises i de følgende dage. Der blev således ikke observeret en fjernelse af DMS under forsøgsperioden, heller ikke som følge af adsorption. Derfor antages denne observation nærmere at være en tilfældighed end et resultat af mikrobiel og/eller co-metabolsk pesticidfjernelse. Da det heller ikke var muligt at fremme en pesticidfjernelse ved stimulering af metanoxiderende bakterier i pilotskalaforsøgene i Hjørring, kan det konkluderes, at det er vanskeligt at fjerne DMS og DPC fra vandet ved en mikrobiologisk co-metabolsk proces.

Tabel 8. Overblik over koncentrationen af DMS i hhv. indløb, udløb kontrolkolonner og udløb stimuleringskolonner.

| Koncentration/tid | Indløb<br>µg/l | Kontrol 1<br>µg/l | Kontrol 2<br>µg/l | Stimulering 3<br>µg/l | Stimulering 4<br>µg/l |
|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| -37 dage*         | 0,26           | 0,29              | 0,26              | 0,27                  | 0,28                  |
| 7 dage            | 0,47           | 0,48              | 0,49              | 0,44                  | 0,45                  |
| 25 dage           | 0,43           | 0,35              | 0,34              | 0,34                  | 0,42                  |
| 35 dage           | 0,35           | 0,34              | 0,32              | 0,34                  | 0,34                  |
| 53 dage           | 0,37           | 0,36              | 0,36              | 0,39                  | 0,39                  |

\* Inden metantilsætning startede.

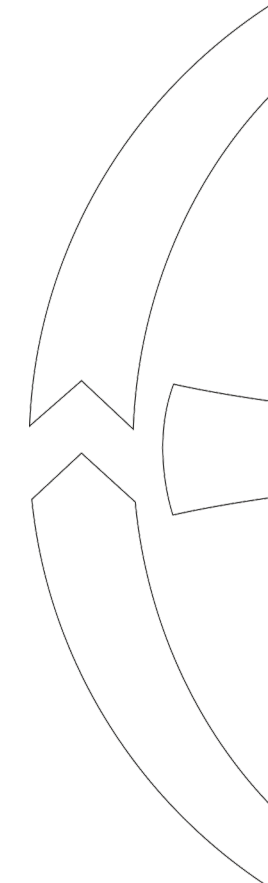
## 5.4 Konklusion

Hedegaard et al., 2014; Hedegaard et al., 2018; Wang et al., 2019; Wang et al., 2021 har publiceret resultater fra flere forsøg omhandlende visse pesticidresters (fx bentazon-methylchlorprop, trichloroethen, benzotriazole og 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) potentiale for mikrobiel co-metabolsk nedbrydning i sandfiltre. På trods af de publicerede resultater kunne en mikrobiel co-metabolsk nedbrydning af DMS eller DPC ikke stimuleres i nærværende studie. De første laboratorieforsøg viste indikationer af en mindre, mikrobiel nedbrydning af DMS og DPC, men det var ikke muligt at eftervise og opnå en endelig dokumentation, på trods af gennemførelse af flere forsøg i laboratorieskala. Stimuleringerne med hhv. kobbertilsetning i kombination med ammonium og/eller metan, viste en tydelig effekt i form af tilvækst af de bakterier, som antages at muliggøre den co-metabolske nedbrydning af DMS og DPC, nemlig AOB, NOB og MOB.

Under pilotskalaeksperimentet ved Verdo målrettet stimulering af nitrifikanter var det muligt at fremme AOB- og NOB-populationen i de stimulerede kolonner sammenlignet med kontrolkolonnerne. Men på trods af stimuleringen af AOB- og NOB-populationen blev der ikke observeret en reduktion af DPC i vandet i løbet af de 110 dage, som eksperimentet varede. Tilsvarende resultater blev opnået fra pilotskalaopstillingen ved Hjørring Vand. Også her kunne en stigning i såvel totalt antal bakterier som metanoxiderende bakterier observeres ved stimulering med metan, omend der ikke blev observeret nogen stimulerende effekt på fjernelse af DMS fra vandet i løbet af de 55 dage, som eksperimentet varede.

Den samlede konklusion ud fra de gennemførte forsøg er, at den initialt observerede indikation om en mindre, mikrobiel nedbrydning af DMS og DPC i forsøgene i laboratorieskala ikke kunne eftervises. Dette blev yderligere bekræftet under pilotskalaforfølgene, hvor der ikke blev observeret reduktion af hverken DMS eller DPC i kolonnerne, hverken ved Verdo eller Hjørring Vand. Det konkluderes derfor samlet, at co-metabolsk stimulering tilsyneladende ikke er en farbar vej til fjernelse af de omhandlende pesticidrester fra vandet. De nævnte stimuleringer af sandfiltermikrober kunne muligvis være nyttige i forbindelse med

en mikrobiologisk medieret nedbrydning af andre pesticidrester i vandet, men hvad angår DMS og DPC, er der et klart behov for at følge en anden teknologisk tilgang fx i form af filtrering med aktivt kul og/eller resiner.



---

## 6 Litteraturliste

Wagner, 2019: Copper-Induced Stimulation of Nitrification in Biological Rapid Sand Filters for Drinking Water Production by Proliferation of *Nitrosomonas* spp. | Environmental Science & Technology (acs.org)

Mohanty, 2019: Frontiers | Nitrification Rates Are Affected by Biogenic Nitrate and Volatile Organic Compounds in Agricultural Soils | Microbiology (frontiersin.org)

Fernandez-Fortaina et al., 2016: Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrataion and heterotrophic conditions - ScienceDirect

Wang et al., 2022: Unravelling the contribution of nitrifying and methanotrophic bacteria to micropollutant co-metabolism in rapid sand filters - PubMed (nih.gov)

Wu et al., 2019: Co-metabolic enhancement of 1H-1,2,4-triazole biodegradation through nitrification - PubMed (nih.gov)

Denecke og Liebig, 2003: Effect of carbon dioxide on nitrification rates | SpringerLink

Green et al., 2002: The effect of CO<sub>2</sub> concentration on a nitrifying chalk reactor - ScienceDirect

Dagley og Hinshelwood, 1938: 364. Physicochemical aspects of bacterial growth. Part II. Quantitative dependence of the growth rate of *Bact. lactis aerogenes* on the carbon dioxide content of the gas atmosphere - Journal of the Chemical Society (Resumed) (RSC Publishing)

Wagner et al., 2016: Copper deficiency can limit nitrification in biological rapid sand filters for drinking water production - ScienceDirect

Hedegaard et al., 2018: Evidence of co-metabolic bentazone transformation by methanotrophic enrichment from a groundwater-fed rapid sand filter - ScienceDirect

Papadopoulou et al., 2018: Methanotrophic contribution to biodegradation of phenoxy acids in cultures enriched from a groundwater-fed rapid sand filter | SpringerLink

Wagner et al., 2019: Copper-Induced Stimulation of Nitrification in Biological Rapid Sand Filters for Drinking Water Production by Proliferation of *Nitrosomonas* spp. | Environmental Science & Technology (acs.org)

Mohanty et al., 2019: Nitrification Rates Are Affected by Biogenic Nitrate and Volatile Organic Compounds in Agricultural Soils - PMC (nih.gov)

Hedegaard et al., 2014. Processes of microbial pesticide degradation in rapid sand filters for treatment of drinking water. Paper presented at 2014 IWA World Water Congress & Exhibition, Lisbon, Portugal

---

Wang et al., 2019: Acclimated methanotrophic consortia for aerobic co-metabolism of trichloroethene with methane - ScienceDirect

Wang et al., 2021: Unravelling the contribution of nitrifying and methanotrophic bacteria to micropollutant co-metabolism in rapid sand filters - ScienceDirect

Hanson og Hanson, 1996: Methanotrophic bacteria | Microbiological Reviews (asm.org)

Park og Kim, 2019: Application and development of methanotrophs in environmental engineering | SpringerLink

Daims et al., 2015: : Complete nitrification by Nitrospira bacteria | Nature

Tang K, et al., 2017: Removal of pharmaceuticals in conventionally treated wastewater by a polishing moving bed biofilm reactor (MBBR) with intermittent feeding, *Bioresource Technology* 236, 77-86.

Tang K, et al., 2021: Impact of intermittent feeding on polishing of micropollutants by Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR). *Journal of Hazardous Materials*, Volume 403, Epub

Xu Y , Z Yuan, BJ Ni - *ACS Sustainable chemistry & engineering*, 2017  
Impact of ammonium availability on atenolol biotransformation during nitrification. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2017, 5, 8, 7137–7144

Hedegaard MJ, Schliemann-Haug MA, Milanovic N, Lee CO, Boe-Hansen R and Albrechtsen H-J (2020). Importance of Methane Oxidation for Microbial Degradation of the Herbicide Bentazone in Drinking Water Production. *Front. Environ. Sci.*, 23 June 2020

Thomsen AH, Kisbye-Bovin E, Friis Truelsen S, Baun A, Albrechtsen H-J, (2021). Rensningsmuligheder for pesticider - med fokus på aktivt kul og membraner, *Miljøstyrelsen* nr. 53. <https://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/2021/10/978-87-7038-350-9.pdf>