

Biocider i urbane småsøer

BEKF nr. 170 Oktober 2017

Udgiver: Miljøministeriet

Forfattere: Jes Vollertsen Kai Bester Elise A. Rudelle Ulla Bollmann Greta Minelgaite Diana A. Stephansen Asbjørn Haaning Nielsen Morten Lauge Pedersen

ISBN: 978-87-93529-70-0

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

1.	Introduktion	12
1.1	Baggrund	12
1.2	Kilder til biocider i urban regnafstrømning	12
1.3	Byens regnvandssystem	13
1.4	Økosystemer i byens regnvandssystem	13
1.5	Stoffjernelse i byens regnvandssystemer	14
1.6	Den undersøgte problemstilling	15
2.	Metoder	17
2.1	De undersøgte søer	17
2.2	Biocider adresseret i projektet	20
2.3	Kemiske analysemetoder	23
2.3.1	Biocidanalyser	23
2.3.2	Analyse af fosfor, kvælstof og klorofyl	25
2.4	Biologiske analysemetoder	26
2.4.1	Bentiske diatoméer i sedimenter	26
2.4.2	Fytoplankton	26
2.5	Fytoplankton og bentiske diatoméer i regnvandssøer	26
2.5.1	Bentiske diatoméer	26
2.5.2	Fytoplankton	28
2.5.3	Statistisk behandling af alge data	28
2.6	Fytoplanktonsamfunds respons på biocidpåvirkning	29
2.6.1	Mikrokosmer med vandfase alene	29
2.6.2	Mikrokosmer med vandfase og sediment	30
2.6.3	Mesokosmer i en regnvandssø	32
2.7	Nedbrydning af biocider i urbane småsøer	34
2.7.1	Prøvetagningssteder og sedimentekstraktion	34
2.7.2	Sorptionskapacitet	34
2.7.3	Sorptionskinetik i sedimentsuspensioner	34
2.7.4	Nedbrydning af biocider i sediment mikrokosmer	35
2.7.5	Nedbrydning af biocider i fytoplanktonmesokosmer	36
2.7.6	Tidslig udvikling af biocidkoncentration i en sø	36
2.7.7	Simulering af biocidnedbrydning i sediment mikrokosmer	37
2.8	Sorption og omsætning til filterjord	38
2.8.1	Sorption af biocider til filterjord	38
2.8.2	Omsætning af biocider til filterjord	39
2.9	Simulering af regnvandssøer	39
2.9.1	Den simplificerede biocidmodel	40
3.	Resultater og diskussion	42
3.1	Sorption af biocider til sediment	42
3.1.1	Sorptionskapacitet	43
3.1.2	Sorptionskinetik i sedimentsuspensioner	46
3.2	Fjernelse og nedbrydning af biocider i sediment mikrokosmer	47
3.2.1	Målt fjernelse og nedbrydning af biocider	47
3.2.2	Simulering af biocidnedbrydning i sediment mikrokosmer	51

3.2.3	Nedbrydning af biocider i mesokosmer i en regnvandssø	57
3.2.4	Udvikling i biocidkoncentrationer i en regnvandssø over tid	61
3.2.5	Simulering med lange historiske regnserier	63
3.3	Sorption og omsætning til filterjord	67
3.3.1	Hydraulisk karakterisering af jordfiltre	67
3.3.2	Sorption til filterjord	68
3.3.3	Omsætning i filterjord	72
3.4	Alger i regnvandssøer	74
3.4.1	Biocider målt i de 10 regnvandssøer	74
3.4.2	Bentiske diatoméer	78
3.4.3	Fytoplankton	90
3.5	Mikro- og mesokosmosundersøgelser	103
3.5.1	Mikrokosmer med vandfasen alene	103
3.5.2	Mikrokosmer med sediment og vandfase	111
3.5.3	Mesokosmer i en regnvandssø	118
3.5.4	Størrelsesfordeling af individer i udvalgte taxa	126
3.5.5	Taxonomisk sammensætning af fytoplanktonsamfundene	132
4.	Konklusion	138
5.	Perspektivering	141
6.	Referencer	142

Forord

Projektet om effekt og skæbne af biocider i urbane småsøer blev gennemført i perioden august 2013 til august 2016 og er finansieret af Miljøstyrelsens program for Bekæmpelsesmiddelforskning. Projektet blev udført som et samarbejde mellem Aalborg Universitet, Institut for Byggeri og Anlæg og Aarhus Universitet, Institut for Miljøvidenskab. Projektet har været fulgt af følgegruppen VAND bestående af:

Specialkonsulent Marian Damsgaard Thorsted, Videncentret for Landbrug. Professor Hans Christian Bruun Hansen, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet. Professor Poul Løgstrup Bjerg, Institut for Vand og Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet. Lektor Bjarne W. Strobel, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet. Adj. Professor Merete Styczen, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet. Afdelingsleder Niels Lindemark, Dansk Planteværn. Seniorforsker Vibeke Ernstsen, GEUS. Anne Louise Gimsing, Miljøstyrelsen. Anne Munch Christensen, Miljøstyrelsen. Henrik F. Brødsgaard, Miljøstyrelsen. Lektor Carsten Tilbæk Petersen, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet. Forskningsleder Nikolai, Seksjon for Ferskvannsbiologi, NIVA, Norsk Institutt for Vannforskning. Professor Jes Vollertsen, Institut for Byggeri og Anlæg, Aalborg Universitet. Professor Jens Aamand, GEUS. Seniorforsker Anders Johnsen, Geokemisk Afdeling, GEUS. Morten Tune Strandberg, Institut for Bioscience, Silkeborg, Aarhus Universitet.

Rapporten er struktureret omkring et antal hovedtemaer, hvoraf det væsentligste indhold efterfølgende vil blive publiceret i et antal videnskabelige tidsskrifter. Resultater i nærværende rapport vil derfor i et vist omfang kunne genfindes i disse senere publicerede artikler. Arbejdet vil blive publiceret i artikler indenfor følgende emnekredse:

- · Bentiske diatomé-hyppighed og diversitet i regnvandssøer
- Fytoplankton-hyppighed og diversitet i regnvandssøer
- · Fytoplankton-samfunds respons på biocidbelastning mikro- og mesokosmos studier
- · Sorption og omsætning af biocider til sediment i regnvandssøer
- · Sorption og omsætning af biocider i afstrømmet regnvand til filterjord

Sammenfatning

Dette projekt har adresseret urbane biocider i afstrømmet regnvand i to dele af byens regnvandssystem: Regnvandssøer og filterjorde. Disse konstruerede systemer er væsentlige elementer af byens regnvandshåndtering, der finder stadig større udbredelse i forbindelse med klimatilpasning og reduktion af byernes påvirkning af vandmiljøet. Projektet har undersøgt to aspekter af disse tekniske anlæg.

- Projektets første aspekt adresserer tilbageholdelse og omsætning af biocider i regnvandssøer og filterjorde. Regnvandssøer kaldes af afløbsteknikere for våde regnvandsbassiner, og konstrueres typisk til at håndtere afstrømmet regnvand fra 10 til 100 ha opland. Filterjord anvendes til at rense regnvand før udledning eller nedsivning. Systemer med filterjord håndterer typisk afstrømmet regnvand fra mindre oplande, ofte mellem 100 og 1.000 m² opland.
 - 1.1. Tilbageholdelse og omsætning af biocider i regnvandssøer: Projektet har undersøgt, hvordan biocider sorberer til og omsættes i sedimenter fra regnvandssøer. Med udgangspunkt i disse eksperimentelle undersøgelser, er der opstillet en numerisk model for tilbageholdelse og omsætning af biocider i regnvandssøer. Modellen blev brugt til at vurdere, hvordan disse søer modificerer belastningen på den nedstrøms recipient.
 - 1.2. Tilbageholdelse og omsætning af biocider i filterjord: Projektet har set på, hvordan biocider sorberer til filterjord, og har undersøgt parametre for sorptionen og omsætningen. Herved er der skabt et bedre grundlag for at kunne vurdere, hvordan disse jorde modificerer belastningen på en efterfølgende recipient.
- 2. Projektets andet aspekt adresserer algesamfund i regnvandssøer og hvordan disse påvirkes af biocider i afstrømmet regnvand. Regnvandssøer har typisk et overfladeareal på 1.000 til 10.000 m² og ligner på mange måder naturlige småsøer. Der etablerer sig da også hurtigt samme slags flora og fauna i regnvandssøer som i naturlige småsøer. I økologisk forstand bliver disse konstruerede vandsystemer i løbet af få år til diverse økosystemer i lighed med naturlige småsøer. De urbane regnvandssøer forbliver derfor ikke tekniske anlæg i biologisk forstand, men udvikler sig hurtigt til biotoper for en lang række dyr og planter. De bliver omfattet af naturbeskyttelseslovens §3 (søer), og det er ikke ualmindeligt, at der etablerer sig arter omfattet af Bilag IV i EU's habitatdirektiv. Den flora og fauna, der etablerer sig i disse søer, udsættes for den koncentrerede biocidafstrømning fra det urbane opland. Regnvandssøer er derfor blandt vores mest belastede vandområder med hensyn til biocider. Projektet har set på, hvordan regnvandssøers algesamfund påvirkes af urbane biocider. Dette er gjort i tre delundersøgelser:
 - 2.1. Bentiske diatomé-samfund i regnvandssøer: Ni regnvandssøer blev undersøgt for forekomst af bentiske diatoméer i den øverste centimeter af sedimentet. Regnvandssøer modtager overfladevand med højt indhold af tørstof, og den øverste centimer svarer til cirka 1 års sedimentdannelse. De 9 søer er udvalgt, så de repræsenterer en gradient af biocidbelastning, gående fra søer, der kan forventes at være ubelastede med biocider (søer til håndtering af regnvand fra motorveje) til søer, der kan forventes at være højere belastet (søer i boligkvarterer og industriområder). Diatoméer er i videst muligt omfang kvantificeret til slægtsniveau. Samfundene er derpå sammenholdt med målte biocidkoncentrationer i de 9 søer.

- 2.2. Fytoplanktonsamfund i regnvandssøer: Ti regnvandssøer blev undersøgt for forekomst af fytoplankton. Undersøgelsen omfattede de samme søer som bentiske diatoméer, plus én yderligere sø. Fytoplankton blev i videst muligt omfang kvantificeret til slægtsniveau. Samfundene blev derpå sammenholdt med målte biocidkoncentrationer i de 10 søer.
- 2.3. Fytoplanktonsamfunds respons på biocidbelastning mikro- og mesokosmos studier: To mikrokosmosundersøgelser og en mesokosmosundersøgelse blev gennemført. Mikrokosmerne blev etableret i laboratoriet, mens mesokosmerne blev etableret i en urban regnvandssø. Den første mikrokosmosundersøgelse anvendte 1-L kosmer indeholdende søvand. Den anden undersøgelse anvendte sedimentsøjler (Ø50 mm) med ovenstående søvand. Mesokosmosundersøgelsen anvendte søjler (Ø50 mm) placeret i en urban regnvandssø. I alle kosmosforsøg blev der tilsat biocider i koncentrationer op til 1000 ng L⁻¹.

Biociderne methylisothiazolinone (MI), benzoisothiazolinon (BIT), octylisothiazolinone (OIT), dichloroisothiazolinone (DCOIT), carbendazim (CD), iodocarb (IPBC), terbutryn (TB), cybutryne (irgarol 1051) (IRG), isoproturon (IP), diuron (DR), tebuconazole (TBU), propiconazole (PPZ) og mecoprop (MCPP) indgik i varierende grad i projektets forskellige aspekter.

Resultaterne af undersøgelserne omkring omsætning og tilbageholdelse af biocider i regnvandssøer viste, at sedimentet i søerne spiller en væsentlig rolle for tilbageholdelse af biocider før udledning til den nedstrøms recipient. Sedimenterne bidrager væsentligt til en udligning af biocidkoncentrationer ved at sorbere dem under spidsbelastninger, og derpå igen at frigive dem under lavere belastninger. Herved reduceres pulsbelastninger på den nedstrøms recipient under ekstreme forhold med en til to dekader. Sedimentet bidrager også med en vis omsætning af biociderne, så der samlet sker en reduktion af biocidudledning til den videre recipient.

Resultaterne for filterjord viste at sorption af biocider er proportional med jordens indhold af organisk stof. Filterjorde er ofte en blanding af sand og kunstigt tilsat organisk jord som f.eks. spagnum, og et højere indhold heraf vil derfor give en bedre tilbageholdelse af de problematiske stoffer. Den biologiske omsætning af biociderne varierede en del i forhold til det konkrete biocid, og opholdstider i spændet fra timer til dage kunne for nogle af biociderne give en reduktion i den udledte mængde.

Bentiske diatomé-samfund i regnvandssøer viste 49 identificerede slægter i de undersøgte søer. Prøverne til bestemmelse af diatoméer blev i hver sø udtaget 5 steder jævnt fordelt langs søens perimeter. Stederne udviste væsentlig grad af similaritet, og blev derfor samlet til én prøve per sø. De 9 prøver udviste høj grad af similaritet søerne imellem. Prøverne fra motorvejssøer (3 søer) udviste den største grad af indbyrdes similaritet, mens der var mindre similaritet mellem prøver fra disse søer og prøver fra søer, der fik vand fra industrioplande eller beboelsesoplande. Forskellen mellem søer i beboelsesoplande og industrioplande var ikke signifikant. DCA-analyse af datasættet tydede på, at der var korrelation mellem analysens mest forklarende parameter og mecoprop, terbutryn og propiconazole. Parameterens forklaringsværdi var relativt beskeden, og resultatet skal derfor tages med forbehold. Fytoplanktonsamfund i regnvandssøer viste 105 identificerede taxa i de 10 søer, der indgik i undersøgelsen. Prøverne til bestemmelse af fytoplankton blev i hver sø udtaget 5 steder jævnt fordelt i søen. Stederne udviste stor grad af similaritet, og blev derfor samlet til én prøve per sø. Når de forskellige taxa blev grupperet efter række, var similaritet af antal individer og deres biovolumen generelt lille regnvandsøerne imellem. Der var ingen tydelig tendens til, at søer med forskellige typer oplande (motorvej, beboelse, industri) grupperede sammen. DCA-analyse af datasættet viste ingen klar tendens til korrelation mellem analysens mest forklarende akser og de målte biocider. Fytoplanktonsamfundenes variation søerne imellem må derfor tilskrives andre parametre end biocider.

Fytoplanktonsamfunds respons på biocidbelastning blev undersøgt i dosis-respons forsøg i mikrokosmos- og mesokosmosforsøg. Mikrokosmosforsøgene blev dels udført med vandfase alene, og dels med en kombination af vandfase og sediment. Mesokosmosforsøgene blev udført i én af regnvandssøerne ved at isolere en vandfase/sediment søjle i selve søen. I mikro-kosmosforsøgene med vandfase alene blev der fundet 46 taxa, mens der blev fundet 52 taxa i mikrokosmer med vandfase og sediment og 40 taxa i mesokosmosforsøgene. Under ét tydede disse forsøg ikke på korrelation mellem de tilsatte biocider og sammensætningen af de fundne taxa. Enkelte tendenser kunne ses for nogle af forsøgene, i form af at kosmer med de højeste koncentrationer af biocider nogen gange skilte sig ud. Tendenserne var ikke entydige, og kan skyldes tilfældige variationer i kosmerne. Der blev endvidere set en mulig tendens til, at biociderne i kosmerne påvirkede størrelse af visse taxa.

Samlet set tydede undersøgelserne af alger i regnvandssøer på, at biocider i de undersøgte koncentrationer ikke førte til væsentlige ændringer af fytoplanktonsamfundene på det undersøgte taksonomiske niveau. Biocider i afstrømmet regnvand kan muligvis have ført til en påvirkning af diatomé-samfundene. Regnvandssøer er påvirket af mange andre faktorer end biocider, og mulige effekter af biocider i afstrømmet regnvand kan derfor have været overskygget af andre typer af påvirkninger.

Summary

This project has addressed urban biocides in the stormwater of two parts of the urban stormwater system: Stormwater lakes and soil filters. These engineered systems are essential elements of urban stormwater management, and are becoming increasingly more common in the context of climate adaptation and reduction of urban impacts on the aquatic environment. The project has investigated two aspects of these technical systems.

- The project's first aspect addresses retention and degradation of biocides in stormwater lakes and soil filters. Stormwater lakes are called wet detention ponds or retention ponds by urban drainage engineers, and typically constructed to handle stormwater from catchments of 10 to 100 ha. Soil filters are used to treat stormwater before discharge or infiltration into the subsurface. Systems applying soil filters typical handle stormwater from smaller catchments, often between drainage areas of 100 and 1,000 m².
 - 1.1. Retention and degradation of biocides in stormwater lakes: The project studied how biocides adsorb to, and are degraded in, sediments from stormwater lakes. Based on these experimental studies, a numerical model for retention and degradation of biocides in stormwater lakes was establishes. The model was used to assess how such lakes modify the biocide load on downstream recipients.
 - 1.2. Retention and degradation of biocides by soil filters: The project has studied how biocides adsorb to soil filters, and has studied parameters governing sorption and degradation. This has created an improved basis for assessing how these filters modify the biocide load on a subsequent recipient.
- 2. The project's second aspect addresses algal communities in stormwater lakes and how these are affected by biocides in the stormwater runoff. Stormwater lakes typically have a surface area of 1,000 to 10,000 m² and are in many ways similar to natural ponds. In these lakes a flora and fauna similar to that of natural lakes rapidly is established. Within a few years, these engineered water systems host ecosystems in line with those of natural ponds. They furthermore are covered by §3 of the Danish Nature Conservation Act (lakes), and it is not uncommon to find species in these lakes which are covered by Annex IV of the EU Habitats Directive. The flora and fauna that establishes itself in these lakes does, though, become exposed to the concentrated biocide runoff from the urban drainage area. Stormwater lakes are hence among our most exposed waters with regard to biocides. The project has looked at how the algal communities of the stormwater lakes are affected by urban biocides. This is done in three sub-investigations:
 - 2.1. Benthic diatom communities in stormwater lakes: Nine stormwater lakes were examined for the presence of benthic diatoms in the top centimeter of the sediments. Stormwater lakes receive surface water with a high solid content, and the top centimeter correspond to about 1 year of sediment formation. The 9 lakes are selected to represent a gradient of biocide loading, ranging from lakes that are likely to be unaffected by biocides (lakes for handling rainwater from highways) to lakes that are likely to receive higher biocide loadings (lakes in residential areas and industrial areas). Diatoms are, as far as possible, quantified to the genus level. The communities are then compared with measured biocide concentrations in the 9 lakes.

- 2.2. Phytoplankton communities in stormwater lakes: Ten stormwater lakes were examined for the presence of phytoplankton. The survey covered the same lakes as benthic diatoms, plus one additional lake. To the extent possible, phytoplankton was quantified to the genus level. Communities were then compared with measured biocide concentrations of the 10 lakes
- 2.3. The response of phytoplankton communities to biocide exposure in micro- and mesocosm studies: Two microcosm studies and one mesocosm study was conducted. Microcosms were established in the laboratory while the mesocosm study was established in an urban stormwater lake. The first microcosm study used 1-L cosms containing lake water. The second study used sediment columns (50 mm) with lake sediments and lake water. The mesocosm columns (Ø500 mm) were located in an urban stormwater lake. In all experiments biocide was added to the cosms at concentrations up to 1000 ng L⁻¹.

The biocides methylisothiazolinone (MI), benzoisothiazolinon (BIT), octylisothiazolinone (OIT), dichloroisothiazolinone (DCOIT), carbendazim (CD), iodocarb (IPBC), terbutryn (TB), cybutryne (irgarol 1051) (IRG), isoproturon (IP), diuron (DR), tebuconazole (TBU), propiconazole (PPZ) and mecoprop (MCPP) were analyzed to varying degrees in the course of the project.

The results of the study on retention and degradation of biocides in stormwater lakes showed that the sediments of the lakes play an important role in the retention of biocides prior to discharge to a downstream recipient. The sediments contribute significantly to equalizing biocide concentrations by sorbing them during peak events, and then again to release them when concentrations become lower. This reduces pulse loads on downstream recipients. The sediments also contribute with a certain degradation of the biocides, so that the total biocide discharge to the downstream recipient is somewhat reduced.

The results for the soil filters experiments showed that the sorption of biocides is proportional to soil organic matter content. Filters soil are often a mixture of sand and artificially added organic soils such as peat. A higher content of such compounds will provide a better retention of the problematic substances. The biological decomposition of biocides varied considerably in relation to the specific biocide and their residence times in the filter. Residence times in the range of hours to days could for some of the biocides provide a reduction in the amount of biocide discharged.

Benthic diatoms communities in stormwater lakes showed 49 identified genera in the studied lakes. The samples for determination of diatoms were in each lake collected at 5 locations evenly distributed along the lake's perimeter. The locations showed considerable similarity, and were therefore combined into one sample per lake. The 9 samples showed high degree of similarity between lakes. Samples from highway lakes (3 lakes) showed the greatest degree of mutual similarity, while there was less similarity between samples from these lakes and samples from lakes that received water from industrial catchments or residential catchments. The difference between the lakes with residential catchments and industrial catchments was not significant. DCA analysis of the data set indicated that there was correlation between the most explanatory axis and mecoprop, terbutryn and propiconazole. Axis explanatory value was relatively modest, and the results should therefore be treated with caution.

Phytoplankton in stormwater lakes showed 105 identified taxa in the 10 lakes surveyed. The samples for the determination of the phytoplankton in each lake were collected from 5 locations evenly distributed in the lake. The sites showed a high degree of similarity, and were therefore combined into one sample per lake. When the various taxa were grouped by phylum, the similarity between stormwater lakes with respect to number of individuals and their bio-volume was generally small. No clear tendency was seen for lakes with different types of catchments (highway, residential, industrial) grouping together. DCA analysis of the data set showed no clear

trend of correlation between the most explanatory axes and the measured biocides. The phytoplankton community variation between lakes must therefore be attributed to other parameters than biocides.

The response of the phytoplankton communities to biocides were studied in dose-response experiments in microcosms and mesocosms. The microcosm experiments were partly conducted with the water phase only and partly with a combination of water phase and sediments. The mesocosm experiment was carried out in one of the stormwater lakes by isolating a water phase / sediment column in the lake. In the microcosm experiments with water phase only, there was found 46 taxa, while 52 taxa were found in microcosms with water phase and sediments and 40 taxa in mesocosm experiments. All in all, these tests did not suggested any correlation between the added biocides and composition of the detected phytoplankton communities. Some trends could be seen for some of the experiments in terms of cosms with the highest concentrations of biocides sometimes differing from the rest of the cosms. The trends were not clear, and may be due to random variations in the cosms. It was furthermore observed that the biocides in cosms possibly affected the bio-volume of some of the taxa.

Overall, the experiments on algae in the stormwater lakes indicated that biocides in the tested concentrations did not lead to significant changes in phytoplankton communities on the taxonomic level addressed. Biocides in stormwater may, however, have influenced diatom communities. Stormwater lakes are affected by many factors other than biocides, and possible effects of biocides in stormwater may have been over-shadowed by other types of influences.

1. Introduktion

1.1 Baggrund

En stor del af byens småsøer er konstruerede til at modtage regnvand, men har med tiden opnået et akvatisk økosystem på linje med oprindelige søer i det åbne land. Regnvandet fra byoverfladerne indeholder biocider, der potentielt vil påvirke regnvandssøernes økologiske tilstand (Tixier et al., 2011). Mens det afstrømmede regnvand står i disse småsøer, vil der endvidere ske en vis nedbrydning af biociderne. Dette vil igen være betydende for såvel den resulterende biocidbelastning af selve søen, som den følgende belastning af den bynære recipient, til hvilken søen udleder. Vi har i dag nogen viden om biocidfrigivelse fra byens overflader, mens vores viden om biocidernes skæbne i og betydning for regnvandssøernes økosystemer er beskeden. Den nødvendige viden for at vurdere biocidbelastning på disse småsøer samt på slutrecipienter er derfor ikke til stede. Nærværende projekt bidrager til at belyse denne problemstilling og kvantificere en række af de involverede processer.

1.2 Kilder til biocider i urban regnafstrømning

Der tilsættes biocider til malinger og bygningsmaterialer for at beskytte disse mod uønsket begroning af alger og svampe (Bucheli et al., 1998; Burkhardt, 2008; Burkhardt et al., 2009). Endvidere tilsættes biocider til malinger for at sikre holdbarhed, såvel før som efter at malingsspanden er åbnet. Efter udvendig påførsel på bygninger, udsættes materialerne for vind og vejr, hvilket fører til en langsom frigivelse af de tilsatte biocider. Under regn vaskes der derpå biocider af overfladerne, som føres med det afstrømmende regnvand (Burkhardt, 2008; Burkhardt et al., 2012; Bollmann et al., 2014; Gasperi et al, 2014; Bollmann et al., 2016).

I modsætning til for eksempel pesticider fra landbruget, har biocider fra urbane områder været mindre i fokus, et forhold der synes at være under forandring. Således har den europæiske kommission senest præsenteret forholdsvis lave grænseværdier for visse biocider i overflade-vande. Kommissionen angiver, at der i stærkt modificerede, ferske overfladevande som års-middel blot må være: cybutryne: 2,5 ng L⁻¹, terbutryn: 65 ng L⁻¹, diuron: 200 ng L⁻¹ og isoproturon: 300 ng L⁻¹ (EU, 2013). Koncentrationer der i alt fald for nogen af stofferne kan vise sig vanskelige at overholde for en række regnvandssøer og nærrecipienter (Bollmann et al., 2014). Bollmann et al. (2014) fandt endvidere, at de "højeste tilladte koncentration" angivet af kommissionen (cybutryne: 16 ng L⁻¹, terbutryn: 340 ng L⁻¹, diuron: 1800 ng L⁻¹ og isoproturon: 1000 ng L⁻¹) i enkelte tilfælde blev overskredet. De fandt således terbutryn over grænseværdien i en håndfuld hændelser, og en enkelt gang i koncentrationer på hele 1840 ng L⁻¹.

Der foreligger kun et relativt beskedent antal undersøgelser af biociders forekomst i afstrømmet regnvand, som alle peger i retning af, at biocider under de rette omstændigheder kan forekomme i betydelige koncentrationer. Således undersøgte Wittmer et al. (2010; 2011a) den relative betydning af biocider og pesticider fra urbane arealer versus rurale arealer. De konkluderede, at i et opland med blandet rural og urban anvendelse, spillede de urbane biocider mindst den samme rolle for den samlede recipientbelastning som de rurale pesticider. Dette på trods af, at den samlede anvendelse af biocider i området var væsentlig mindre end den samlede anvendelse udgjorde cirka 23 mg capita⁻¹ år⁻¹ i urban afstrømning, mens terbutryn udgjorde cirka 16 mg capita⁻¹ år⁻¹. Antages som groft estimat, at de fundne værdier er repræsentative for urban afstrømning i Danmark, svarer dette i runde tal til en årlig afstrømning på 130 kg diuron og 90 kg terbutryn om året.

I et studie af regnafstrømning i et separatkloakeret parcelhuskvarter i Silkeborg, har Bollmann et al. (2014) fundet terbutryn i koncentrationer op til knap 2000 ng L⁻¹. En række andre biocider, f.eks. carbendazim, iodocarb, isoproturon, propiconazole, benzoisothiazolinone, og diuron blev fundet i væsentlige, om end lavere, koncentrationer. Antages som groft estimat, at de fundne terbutryn koncentrationer er repræsentative for danske separatkloakerede oplande, fås en årlig frigivelse af terbutryn i Danmark på i størrelsesorden 100 kg per år. I det studie blev der observeret tydeligt variation i koncentrationer såvel mellem regnhændelser som under den enkelte hændelse. Således blev der specielt efter længere tørvejrsperioder set, at biocider blev frigivet med høje koncentrationer i starten af en regnhændelse, hvorpå koncentrationen i regnvandet klingede af til et nogenlunde konstant og lavere niveau. En lignende observation blev gjort af Burkhardt et al. (2009), hvis resultater siden blev simuleret af Wittmer et al. (2011b), der her viste, at frigivelsen ikke kunne beskrives som simpel diffusion, men at en mere detaljeret procesforståelse måtte bringes i spil.

1.3 Byens regnvandssystem

I enstrengede afløbssystemer (de såkaldte fællessystemer) føres hovedparten af regnvandet fra byoverfladen til kommunalt renseanlæg. I tostrengede systemer (de såkaldte separatsystemer) føres regnvandet direkte til overladerecipient og i visse tilfælde til nedsivning. I dag udføres nye bebyggelser som separatsystemer, og gamle fællessystemer omlægges med tiden til separatsystemer. Som resultat heraf er cirka 53% af Danmarks urbaniserede areal kloakeret med separatsystemer, svarende til 1.200 km² eller 2,8% af Danmarks samlede areal (By- og Landskabsstyrelsen, 2010).

I den senere tid har man observeret, at byens regnvand kan have negativ effekt på overfladevandes økologiske tilstand (Wium-Andersen et al., 2011; Stephansen et al., 2012). For at reducere belastningen på slutrecipienten, anlægger man derfor lavvandede småsøer, som regnvandet passerer før udledning. Her tilbageholdes en stor del af partiklerne i regnvandet, og der sker en vis tilbageholdelse og nedbrydning af opløst stof. For at øge tilbageholdelsen af opløst stof, er man så småt begyndt at supplere med filteranlæg. Disse kan være placeret efter de kunstige småsøer (Vollertsen et al., 2009a) eller som et specielt designet jordlag (filterjord) opstrøms i oplandet (Hatt et al., 2009; Dechesne et al., 2004).

1.4 Økosystemer i byens regnvandssystem

Planter og dyr indvandrer til de kunstigt anlagte småsøer, og i løbet af et par vækstsæsoner etablerer der sig en flora og fauna sammenlignelig med, hvad der findes i oprindelige småsøer i det åben land (Scher and Thiery, 2005; Le Viol et al., 2009; Stephansen et al., 2012). Denne flora og fauna udsættes for biocider fra det tilledte regnvand, med de heraf følgende potentielle skadevirkninger. Samtidigt sker der en tilbageholdelse og omsætning af biocider før udledning til slutrecipient, hvorved belastningen på dennes økosystem reduceres.

Andre faktorer, så som en høj belastning med andre antropogene forurenende stoffer, høj næringsstofbelastning, kort hydraulisk opholdstid, stor grad af opblanding af søens vandvolumen under regn, samt det forhold, at regnvandssøer i langt overvejende grad modtager overfladevand, gør regnvandssøer og naturlige søer til væsentligt forskellige habitater (Hvitved-Jacobsen et al., 2010). Forskellene mellem de økosystemer, der etablerer sig i disse typer habitater, har kun været undersøgt i begrænset omfang. Et af disse studier er Stephansen et al. (i tryk), der sammenlignede regnvandssøer og naturlige, lavvandede søer med hensyn til deres invertebrat samfund. De fandt, at der ikke kunne ses nogen forskel i biodiversitet og samfundsstruktur på de to kategorier af søer, selvom der var højere indhold af såvel PAH som tungmetaller i invertebrater fra regnvandssøer i forhold til de naturlige søer. På tilsvarende vis udførte Le Viol et al., (2009) et studie af motorvejssøer konstrueret til håndtering af afstrømmet regnvand og vurderede, at disse søer bidrog positivt til den regionale biodiversitet. De få studier der findes adresserer primært invertebrater (f.eks. Le Viol et al., 2009; Stephansen et al., i tryk), vertebrater (f.eks. Ackley and Meylan, 2010; Brand et al., 2010) og makrophyter (f.eks. Istenič et al., 2012). Bunden af fødekæden, altså såvel planktoniske som bentiske alger, er væsentlige for den samlede biodiversitet og samfundsstruktur i en sø (John et al., 2011), men ligheder og forskelle i alge biodiversitet og samfundssammensætning i regnvandssøer og naturlige søer har til dato ikke været undersøgt. Følgelig har det heller ikke været undersøgt hvordan disse algesamfund i urbane regnvandssøer reagerer på biocider i det afstrømmende regnvand.

1.5 Stoffjernelse i byens regnvandssystemer

Der er ikke rapporteret undersøgelser af biociders skæbne i regnvandsbelastede småsøer, mens der findes enkelte studier om pesticider i sediment herfra. Således har Jang et al. (2010) undersøgt et større antal bassiner i Florida, USA, der modtager vejvand. De analyserede sedimentet for en række pesticider og herbicider og fandt, at nogle af stofferne forekom helt op i mg kg⁻¹ området. Crawford et al. (2010) undersøgte sediment fra regnvandsbassiner i South Carolina, USA, og fandt at nogle sedimenter indeholdt op til 50 µg kg⁻¹ af de undersøgte pesticider. Moore et al. (2009) undersøgte skæbnen af insekticidet diazinon i kunstige vådområder, ét friholdt for vegetation og to tilplantet med ris. Begge typer vådområde tilbageholdt insekticidet, men de tilplantede vådområder var markant mere effektive end vådområdet friholdt for vegetation. Resultaterne indikerede, at den forbedrede tilbageholdelse ikke skyldtes planteoptag, men at planterne forbedrede muligheden for, at diazinon kunne akkumulere i sedimentet. Lizotte et al. (2009) undersøgte hvordan et kunstigt vådområde ved Mississippi floden i USA tilbageholdt tilsat atrazine, S-metolachlor, og fipronil. De fandt, at pesticidniveauet var reduceret med omkring 80% efter en uge. Lu et al. (2006) så på hvordan diazinon, chlorpyrifos, chlorothalonil, og pendimethalin blev omsat i sedimentet fra et bassin, der blev brugt til at recirkulere vand på en planteskole. De fandt, at stoffernes halveringstid i sedimentet var fra dage til uger, afhængig af redoxforhold og temperatur og de konkluderede, at metoder der tilbageholder partikler, for eksempel bundfældning, er effektive til at nedbringe udledningen af disse stoffer.

En væsentlig funktion af de kunstige, urbane regnvandssøer er fjernelse af partikulært stof ved bundfældning, men også kolloidt og opløst stof bliver i et vist omfang tilbageholdt og nedbrudt (Vollertsen et al., 2009b). Byernes regnvand indeholder høje koncentrationer af fine organiske og uorganiske partikler, og sorption af biocider til disse må forventes at foregå. Da regnvandet ofte henstår i flere uger i disse småsøer, vil en del partikler ende op i bundsedimentet. Kolloider og opløst stof kan ligeledes bindes i sedimentet, blive bundet til biofilm på faste overflader, eller optaget i planter. I såvel vandfase, biofilm som bundsediment vil der ske en nedbrydning af biocider. For eksempel vil der i vandfasen kunne foregå oxidativ eller fotokemisk nedbrydning (Mestankova et al., 2011; Sakkas et al., 2007), og i biofilm og sediment vil der kunne ske en biologisk nedbrydning samtidigt med, at andre organiske forbindelser nedbrydes (Pesce et al., 2010; Robles-González IV et al., 2008). Omfanget og den indbyrdes betydning af disse processer i de urbane småsøer kendes ikke, og det samme gælder for processernes samspil med den dynamiske belastning fra den urbane afstrømning.

En del af byens regnvand passerer gennem jordfiltre (Hvitved-Jacobsen et al., 2010), der kan være opbygget af den jord, der findes på stedet, eller af jord og mineraler med særligt gunstige sorptionsegenskaber (Wium-Andersen et al., 2012). Ved design af disse filtre er der ofte alene tænkt på filterets hydrauliske kapacitet og ikke på dets evne til at tilbageholde forurenende stoffer. Således er der for eksempel blevet fundet væsentlig pesticidforurening under et infiltrationsbassin i New Jersey, hvor bassinbund og undergrund bestod af sandjord. Pesticiderne viste sig at stamme fra bekæmpelse af ukrudt i oplandet til bassinet (Fischer et al., 2003). I laboratorie- og pilotforsøg har jordfiltre vist sig effektive til tilbageholdelse af biocider såvel som andre organiske forureninger. Således undersøgte Janzen et al. (2009) tilbageholdelse af antioxidanter, UV-filtre og plastblødgører i et beplantet filter bestående af spagnum, aktiv slam, sand og grus, og fandt at filteret ved en hydraulisk opholdstid på omkring 2 døgn, tilbageholdt over 96% af de undersøgte stoffer. Ved høj belastning, svarende til en hydraulisk opholdstid på 1 time, faldt tilbageholdelsen for de fleste stoffer til cirka 79-96%, mens den hydrofile plastblødgører N-butylbenzenesulfonamide kun blev fjernet med 21%. For samme filter, men et andet sæt stoffer, fandt Bester and Schäfer (2009) lignende fjernelsesrater. De konkluderede, at indholdet af organisk materiale i form af for eksempel spagnum var afgørende for filterets effekt overfor de undersøgte stoffer. Ligeledes for det samme filter, undersøgte Bester et al. (2011) omsætningen af en række biocider der benyttes i urban facadebehandling (terbutryn, cybutryne, descyclopropyl-cybutryne (cybutryne og terbutryn metabolit), isoproturon, diuron, og dets metabolit diuron-desmonomethyl, benzo-isothiazolinone, n-octyl-isothiazolinone, dichloro-n-octylisothiazolinone og iodocarbamate). De fandt, at ved lav hydraulisk belastning på filteret blev disse stoffer fjernet med mellem 82 og 100%, mens fjernelsesgraden faldt væsentlig når den hydrauliske belastning blev øget – altså svarende til en regnhændelse.

Oftest er der god korrelation mellem jords eller sediments indhold af organisk stof og dets evne til at sorbere organiske biocider eller pesticider (Farenhorst, 2006). En hyppigt anvendt forklaring på dette fænomen er, at det organiske stof funger som en upolær fase, til hvilken de ofte upolære organiske stoffer bindes. Et komplicerende forhold er, at det organiske stof består af en blanding af materialer med varierende egenskaber, samt at biocider og pesticider også binder til uorganiske overflader så som lerpartikler. Er stoffet først sorberet til jordmatrixen, får det ofte en tilstrækkelig opholdstid til, at biologisk nedbrydning kan finde sted (De Wilde et al., 2010). Det vides ikke hvor effektivt biocider fra urbane overflader tilbageholdes under forskellige forhold, især set i lyset af det komplekse samspil mellem sorption, omsætning og den meget variable belastning som urban regnafstrømning udgør.

1.6 Den undersøgte problemstilling

Regnvand fra befæstede urbane arealer og vejarealer i det åbne land indeholder en række problematiske stoffer, der potentielt kan skade vandmiljøet. For at modvirke negative effekter af stofferne, etableres i stigende omfang forskellige typer renseforanstaltning før udledning til recipient. En af disse er kunstige småsøer, hvor semi-naturlige processer reducerer en lang række af de problematiske stoffer før udledningen. En anden er jordfiltre, hvor problematiske stoffer reduceres ved filtrering.

For at kunne vurdere effekten af udledning af biocider til vandmiljøet, skal disse renseforanstaltninger tages i betragtning. I nærværende projekt undersøges hvordan udvalgte biocider forsinkes, udlignes og reduceres i de to systemer: Regnvandssøer og regnvandsfiltre.

De urbane regnvandssøer forbliver ikke tekniske anlæg i biologisk forstand, men udvikler sig hurtigt til biotoper for en lang række dyr og planter. De bliver omfattet af naturbeskyttelseslovens §3 (søer), og det er ikke ualmindeligt, at der etablerer sig arter omfattet af Bilag IV i EU's habitatdirektiv i disse søer. *I nærværende projekt undersøges hvorvidt forskelle i søernes algesamfund afspejler de forskelle i biocidbelastning, der forekommer i regnvandssøer*. Metodisk gøres dette ved at undersøge sammensætningen af algesamfund i en gradient af søer, gående fra søer der ikke kan være belastet med urbane biocider, til søer, der vides at modtage biocider i væsentlige mængder.

I projektet indgår følgende hypoteser:

- <u>Baggrund:</u> Det vides, at urbane, regnvandsbelastede småsøer belastes med en række biocider fra de befæstede arealer, de modtager overfladeafstrømning fra.
 <u>Hypotese:</u> Denne belastning afspejles i de algesamfund, der etablerer sig i søerne. Hypotesen er, at samfundene i søer, der ikke kan modtage biocider, adskiller sig fra søer, hvor der tilføres biocider.
- <u>Baggrund:</u> Det vides, at koncentrationen af biocider i urbane søer påvirkes af kemiske og biologiske tilbageholdes- og nedbrydningsprocesser i sedimenter, biofilm og jord.

<u>Hypotese:</u> Biologisk nedbrydning i bundsediment spiller en væsentlig rolle for koncentrationen af biocider i regnvandsbelastede småsøer. Nedbrydningens betydning for biocidkoncentrationen, samt det absolutte omfang, varerier fra stof til stof, men en kvantificering heraf vil vise, at denne proces er betydningsfuld for biocidbelastning på de akvatiske økosystemer. <u>Hypotese:</u> Sorption i forbindelse med efterfølgende biologisk nedbrydning spiller en væsentlig rolle i forbindelse med udledning af biocider fra jordfiltre for afstrømmet regnvand. Betydningen varierer fra jordtype til jordtype, og fra stof til stof, og en kvantificering heraf vil vise, at denne proces er væsentlig for recipientbelastningen fra denne type anlæg.

 <u>Baggrund:</u> Det vides at biocidindholdet i afstrømmet regnvand varierer stærkt fra hændelse til hændelse, samt at hydraulisk udligning og nedbrydning kan påvirke dels biocidniveauer i småsøer, samt den videre udledning af biocider til slutrecipient.

<u>Hypotese:</u> Modellering af hydraulisk udligning, koblet med modellering af kemisk og biologisk nedbrydning af biocider i regnvandssystemet, kan benyttes til at kvantificere biocid belastningen som urbane småsøer samt bynære vandsystemer udsættes for. Modelleringen kan endvidere kvantificere de tidslige variationer i biocid koncentrationer og benyttes til at opstille statistik for ekstremkoncentrationer.

2. Metoder

2.1 De undersøgte søer

På baggrund af en indledende screening af 28 konstruerede søer til håndtering og rensning af afstrømmet regnvand (i det følgende kaldet regnvandssø), blev 10 regnvandssøer udvalgt til nærmere analyse (Figur 1). Regnvandssøerne blev udvalgt, så de repræsenterer en gradient af forventet biocidbelastning. Der er ikke opereret med referencesystemer, f.eks. naturlige småsøer i det åbne land, da disse ikke nødvendigvis er en hensigtsmæssig reference for regnvandssøer. Regnvandssøer er hydrologisk set ganske forskellige fra naturlige systemer så som rurale småsøer. Hvor småsøer i det åbne land primært fødes med grundvand eller drænvand, modtager regnvandssøer i langt overvejende grad overfladevand (regnvand) afstrømmet fra befæstede arealer. Dette giver væsentlig forskel på såvel tilstrømningens tidsforløb, som sammensætningen af det tilledte vand. Endvidere har regnvandssøer typisk en middel hydraulisk opholdstid (vandudskiftning) på 1-4 uger, altså en væsentlig kortere opholdstid end de fleste oprindelige småsøer i det åbne land. Der er derfor i stedet valgt et antal regnvandssøer, der forventedes at rangerer fra ubelastet med biocid til højt belastet med biocid. Førstnævnte er for eksempel regnvandssøer, der alene modtager afstrømmet vand fra vej- og parkeringsarealer, mens sidstnævnte er regnvandssøer, der modtager en stor del af vandet fra bygninger, hvor facaderne dræner til regnvandsafløbssystemet.

Søerne blev vurderet i forhold til en række praktiske parametre så som tilgængelighed, veldefineret ind- og udløb, uhensigtsmæssigheder så som andefordring, med mere. Udvalget af søer opfylder følgende kriterier:

- Regnvandssøerne rangerer fra forventeligt biocid-ubelastet til biocid-højtbelastet
- De har middeldybder mellem 0,5 og 1,5 m
- Middelvandudskiftning mellem 1 og 6 uger (svarende til et overfladeareal på cirka 100 til 800 m² per reduceret hektar¹)
- Veldefineret ind- og udløb
- Permanent våd hele året
- Uberørt af afstrømning der modtager pesticider fra landbrug
- Uberørt af uhensigtsmæssig adfærd så som andefodring eller kendte ulovlige udledninger
- God tilgængelighed
- Et veldefineret opland der kan inspiceres for facaders opbygning og lignende

De 10 regnvandssøer blev undersøgt for fytoplankton, de 9 for bentiske alger i sedimentet, og de 6 for omsætning af biocider i sedimentet. Fra én af søerne er der endvidere udtaget vand til mikrokosmosforsøg, og søen er brugt til opstilling af mesokosmer samt til måling af den tidslige udvikling af biocidkoncentrationer i en regnvandssø.

Data for regnvandssøerne er vist i Tabel 1 og luftfoto af regnvandssøerne er vist i Figur 3. Tabel 2 viser hvilke af søerne, der indgår i hvilke dele af undersøgelsen. Figur 2 viser et eksempel på et afstrømningsopland til en urban regnvandssø samt søens tilløb og afløb.

¹ Antal reduceret hektar er den del af et opland, der bidrager med vand til afstrømning i rør eller kanaler. Dvs. den del af arealet, hvor regnvand kan sive ned, er fratrukket i dette tal.



Figur 1 Oversigtskort over de undersøgte regnvandsøers placering



Figur 2 Eksempel på afstrømningsopland, tilløb og afløb for en regnvandssø (B1)

Tabel 1 Regnvandssøer der indgår i undersøgelserne

Kode og sted	Koordinater (UTM 32N)	Bassin- areal [m²]	Bassin- volumen [m³]	Middel- dybde [m]	Oplands- areal [ha]	Reduceret areal [ha]	Opholds- tid [døgn]	Oplandskarakterisering
B1. Silkeborg ved Højmarkstoften	X: 534.070 Y: 6.227.835	3.260	2.680	0,82	21,5	7,1	27,4	Parcelhuse med tilhørende veje samt en del af en ringvej. Oplandet er bebygget i 70'erne. Søen er anlagt 2008
B2. Aarhus på nord- siden af Brabrand sø	X: 570.621 Y: 6.222.789	6.050	6.900	1,14	75,4	19	26,3	Boligblokke og et indkøbscenter med tilhørende veje og parke- ringsarealer. Oplandet er bebygget i 70'erne. Søen er anlagt 2008
B3. Århus, Tilst ved Skjoldhøjvej	X: 568.036 Y: 6.225.731	11.900	16.400	1,36	74.0	46.6	25.5	Parcelhuse med tilhørende veje. Oplandet er bebygget 80'erne eller 90'erne Søen er anlagt i 2005
BI. Århus, Tilst ved Skjoldhøjvej	X: 568.684 Y: 6.225.742	11.880	14.330	1,21	92	42,6	24,4	Blandet industri og bolig med tilhørende veje og parkering. Oplan- det er bebygget i 80'erne eller 90'erne Søen er anlagt i 2005
I1. Viborg ved NordreRingvej og Neckel-mannsvej	X: 525.376 Y: 6.258.997	6.500	7.800	1,2	166	69,8	8,1	Industriområde med tilhørende veje og parkeringsarealer. Oplandet er bebygget og søen anlagt i 70'erne eller 80'erne
I2. Aarhus ved Logi- stikparken og Rosbjergvej	X: 565.741 Y: 6.224.270	6.340	7.630	1,2	80,7	21,1	26,2	Nyere industriområde med tilhørende veje og parkeringsarealer. Oplandet er bebygget og søen anlagt 2009
I3. Århus, Tilst ved Bredskiftevej	570.406 6.226.739	7.460	8.950	1,2	43,4	10,9	59,5	Industriområde med tilhørende veje. Oplandet er bebygget i 80'erne eller 90'erne Søen er anlagt i 2007
M1. Hirtshalsmotor- vej, Aalborgvej ved Burholt Bæk	X: 558.476 Y: 6.344.924	4.200	2.100	0,5	5	3,5	43,5	Motorvej, søen konstrueret i 2001
M2. Frederikshavn motorvej ved Vod- skov	X: 563.856 Y: 6.330.257	2.340	1.170	0,5	7,5	6	14,1	Motorvej, søen konstrueret i 1999
M3. Djursland motor- vej, Aarhus ved Hø- gemosevej	X: 569.990 Y: 6.231.191	5.540	2.270	0,5	6,8	4,8	41,8	Motorvej, søen konstrueret sidst i 80'erne



Figur 3 Luftfoto af de 10 søer jf. Tabel 1. Foto er i samme skala. Søerne er navngivet efter deres oplandstype, hvor B står for "bolig", I for "industri", M for "motorvej" i kombination med et efterfølgende løbenummer.

2.2 Biocider adresseret i projektet

I alt 13 biocider har været medtaget i projektet: Methylisothiazolinone (MI); benzoisothiazolinon (BIT); octylisothiazolinone (OIT); dichloroisothiazolinone (DCOIT); carbendazim (CD); iodocarb (IPBC); terbutryn (TB); cybutryne (irgarol 1051) (IRG); isoproturon (IP); diuron (DR); tebuconazole (TBU); propiconazole (PPZ); mecoprop (MCPP). Af disse har terbutryn, cybutryne, diuron og carbendazim indgået i forsøgene med sediment sorption og nedbrydning (afsnit 2.7.2, 2.7.3) samt mikro- og mesokosmosforsøgene (2.6.1, 2.6.2, 2.6.3), mens alle 13 biocider har indgået i de resterende forsøg og undersøgelser.

Kode jf Tabel 1	Fyto- plankton	Diatoméer	Sediment	Mikro- og mesokosmer	Tidsvariation
B1	x	х	x	x	х
B2	x	х	x		
B3	х				
BI	X	х			
11	x	x	x		
12	х	х	х		
13	x	x			
M1	х	х			
M2	Х	х	x		
M3	x	х	x		

Tabel 2 Oversigt over undersøgelser og deres lokalisering

Tabel 3 Biocider medtaget i dette studie.

Navn (forkortelse) CAS nummer	Formel	Fysisk-kemiske egenska- ber	Aktivitet Produkt type (BPD) Pesticid i Danmark
Isothiazolinoner			
Methylisothiazolino- ne (MI) 2682-20-4	N S	Log K _{OW} : < 0 WS: 9,6*105 mg L ⁻¹ k_{H} : 5,0*10 ⁻⁸ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 0.031 mmHg	Bactericid/fungicid Biocid: PT 6, 11, 12, 13 Kosmetik Pesticid: -
Benzisothiazolinone (BIT) 2634-33-5	NH S'	Log K _{OW} : 0.64 WS: 22204 mg L ⁻¹ kH: 6,9*10-9 atm m ³ mol ⁻¹ p _{vap} : 2,6*10-5 mmHg	Bactericid/fungicid Biocid: PT 2, 6, 9, 11, 12, 13 Pesticid: -
Octylisothiazolinone (OIT) 26530-20-1	S N O	Log K _{OW} : 2.61 WS: 309 mg L ⁻¹ k_{H} : 3,6*10 ⁻⁷ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 2,0*10-4 mmHg PNEC: 13 ng L ⁻¹	Bactericid/fungicid Biocid: PT 6, 7, 9, 10, 13 Pesticid: -
Dichlorooctylisothi- azolinone (DCOIT) 64359-81-5		Log K _{OW} : 3.59 WS: 27 mg L ⁻¹ k_{H} : 1,9*10 ⁻⁷ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 2,3*10 ⁻⁶ mmHg PNEC: 8 ng L ⁻¹	Bactericid/fungicid Biocid: PT 7, 8, 9, 10, 11, 21 Pesticid: -
Carbamater			
Carbendazim (CD) 10605-21-7	N NH N O	Log K _{OW} : 1,55 WS: 3112 mg L ⁻¹ k_{H} : 1,5*10 ⁻¹² atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 5,4*10 ⁻⁹ mmHg PNEC: 34 ng L ⁻¹	Fungicid Biocid: PT 7, 9, 10 Pesticid: c
lodocarb (IPBC) 55406-53-6	NH O	Log K _{OW} : 2,45 WS: 436 mg L ⁻¹ k_{H} : 6,9*10 ⁻⁹ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 4,6*10 ⁻⁴ mmHg PNEC: 26 ng L ⁻¹	Fungicid Biocid. PT 6, 7, 8, 9, 10, 13 Kosmetik Pesticid: a

Navn (forkortelse) CAS nummer	Formel	Fysisk-kemiske egenska- ber	Aktivitet Produkt type (BPD) Pesticid i Danmark
Triaziner			
Terbutryn (TB) 886-50-0	N N NH NH NH	Log K _{OW} : 3.77 WS: 42 mg L ⁻¹ k_{H} : 9.1*10 ⁻⁹ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 2.4*10 ⁻⁵ mmHg PNEC: 34 ng L ⁻¹	Algaecid Biocid: PT 7, 9, 10 Pesticid: -
Cybutryne, Irgarol 1051 (IRG) 28159-98-0	S N N N N N N N N N	Log K _{ow} : 4.07 WS: 20 mg L ⁻¹ k_{H} : 5.3*10 ⁻⁹ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 3.7*10 ⁻⁶ mmHg PNEC: 1 ng L-1	Algaecid Biocid: PT 21 Pesticid: -
Phenylureaer			
Isoproturon (IP) 34123-59-6		Log K _{ow} : 2.84 WS: 92 mg L ⁻¹ k_{H} : 1.9*10 ⁻⁹ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 7.9*10-6 mmHg	Algaecide Biocide: PT 7, 10 Pesticide: -
Diuron (DR) 330-54-1		Log K _{OW} : 2.67 WS: 102 mg L ⁻¹ k_{H} : 5.3*10 ⁻¹⁰ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 4.7*10 ⁻⁶ mmHg PNEC: 20 ng L ⁻¹	Algaecid Biocid: PT 7, 10 Pesticid: -
Triazoler			
Tebuconazole (TBU) 107534-96-3	HO N N N CI	Log K _{ow} : 3.89 WS: 97 mg L ⁻¹ k_{H} : 5.1*10 ⁻¹⁰ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 4.6*10 ⁻⁶ mmHg	Fungicid Biocid: PT 7, 8, 9, 10 Pesticid: -
Propiconazole (PPZ) 60207-90-1		Log K _{OW} : 4.13 WS: 11 mg L-1 k_{H} : 14*10 ⁻⁹ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 3.6*10 ⁻⁶ mmHg	Fungicid Biocid: PT 7, 8, 9 Pesticid: a
Andre			_
Mecoprop (MCPP) 93-65-2	CI O OH	Log K _{ow} : 2.94 WS: 471 mg L ⁻¹ k_{H} : 1.8*10 ⁻⁸ atm m ³ mol ⁻¹ p_{vap} : 4.6*10 ⁻⁴ mmHg	Algaecid Tagbeskyttelse (ikke registreret under BPD idet det bruges mod større planter) Pesticid: c

Oktanol-vand fordelingskoefficient (K_{OW}), vandopløselighed (WS), Henry's konstant (K_H) og damptryk (p_{vap}) er beregnet med US EPA EPI SuiteTM v 4.10 (2012).

"Predicted no effect concentration " (PNEC) er efter Burkhardt et al. (2009)

Aktivitet og produkttyper (PT) jævnfør EU's biociddatabase over biocid aktive substanser (EU, 2016): 6 konserveringsmidler til anvendelse i beholdere, 7 konserveringsmidler til overfladefilm, 8 træbeskyttelsesmidler, 9 beskyttelsesmidler til fibermaterialer, læder, gummi og polymeriserede materialer, 10 midler til beskyttelse af byggematerialer, 11 konserveringsmidler til væske i køle- og processystemer, 12 midler mod slim, 13 konserveringsmidler til væsker, der anvendes ved metalbearbejdning, 21 antifoulingmidler. Pesticid a: Angivelse af om stoffet er brugt som pesticid i dansk jordbrug jf. Miljøstyrelsen (2016a)

Pesticid b: Angivelse af om stoffet er brugt som pesticid i dansk havebrug jf. Miljøstyrelsen (2016b)

Pesticid c: Angivelse af om stoffet kan findes på frugt og grønsager solgt med ikke produceret i Danmark jf. Fødevarestyrelsen (2015)

2.3 Kemiske analysemetoder

2.3.1 Biocidanalyser

Biocider blev analyseret dels ved brug af HPLC-MS/MS og dels ved brug af HPLC-MS. I et enkelt tilfælde blev der ekstraheret biocid ved "accelerated solvent extraction".

HPLC-MS/MS

For analyser hvor alle biocider indgik, har der været anvend HPLC-MS/MS (high performance væske kromatografi med tandem masse spektrometri) med elektrospray ionisering i positiv modus (ESI(+)) på et Ultimate 3000 dobbelt gradient lavtryk blanding HPLC-system (*Dionex*, Sunnyvale, CA, USA) koblet til en API 4000 triple-quadrupole-MS (*AB Sciex*, Framingham, MA, USA). Separeringen blev gennemført ved 5°C ved brug af en Synergy Polar-RP kolonne (L=150 mm, ID=2 mm, partikler=4 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). En multistep gradient af vand (A) og methanol (B) med post-column acidification blev brugt jævnfør Bollmann et al. (2014). Gradient: 0 – 3 min 0% B, 3 – 5 min 0 til 50% B, 5 – 15 min 50 til 80% B, 15 – 15,5 min 80 til 100% B, 15,5 – 19 min 100% B, 19 – 20 min 100 til 0% B, 20 – 25 min 0% B. Post-kolonne acidification via T-stykke mellem kolonne og ionkilde: 0.03 mL min⁻¹ af 0,2 % myresyren i vand.

Denne metode har endvidere været anvendt for alle analyser af biocider i sorptions- og omsætningsforsøgene beskrevet i afsnittene 2.7.2 og 2.7.3. I disse analyser blev prøver filtreret på et 0,4 µm GF filter og 100 mL blev opkoncentreret på SPE (solid phase extraction), hvorefter de blev analyseret på HPLC-MS/MS.

Opkoncentreringen blev udført ved at 100 mL prøve blev spiket med 50 μ L of a surrogate standardopløsning indeholdende en blanding af deuterede biocider (1 μ g mL⁻¹ i metanol: methylisothiazolinone-D3, octylisothiazolinone-D17, carbendazim-D4, iodocarb-D6, isoproturon-D6, diuron-D6, terbutryn-D5, cybutryn-D9, tebuconazole-D6, propiconazole-D5, meco-prop-D3). Endvidere 3 mL af 0,2M fosfatbuffer blev tilsat for at justere til pH = 7. En Bakerbond SDB-2 (6 mL, 200 mg) SPE-cartridge blev succesivt konditioneret med 12 mL acetonitrile og 12 mL Millipore-vand. Efter ekstrahering af de 100 mL prøve (ved 2 mL min⁻¹) blev cartridgen skyllet med 12 mL Millipore- vand og let tørret ved vakuum. Det kombinerede eluat af 12 mL acetonitrile og 12 mL metanol

MS/MS parametre

Stofspecifikke MS/MS-parameter: mass-til-ladning precursor ion, mass-til-ladning produkt ioner, declustering potential:

Compound	m/z	m/z	-		05	0)/17
-	Precursor	Produkt	DP	EP	CE	CXP
Methylisothiazolinone	116	101	77	10	32	20
	116	98	75	10	25	18
Methylisothiazolinone-D3	119	101	55	10	29	19
	119	74	45	10	31	13
Benzisothiazolinone	152	134	80	10	32	26
	152	109	90	10	28	21
N-Octylisothiazolinone	214	102	55	10	22	19
	214	57	84	10	30	10
N-Octylisothiazolinone-D17	231	103	47	10	22	5
	231	66	54	10	34	12
Dichloro- N-octylisothiazolinone	282	170	67	10	21	32

	282	71	68	10	27	27
lodocarb	282	165	62	10	26	32
	282	57	62	10	22	10
Iodocarb-D6	291	165	55	10	24	9
	291	66	55	10	24	11
Carbendazim	192	160	82	10	29	31
	192	132	73	10	42	24
Carbendazim-D4	196	164	78	10	28	11
	196	136	81	10	45	13
Isoproturon	207	72	84	10	36	29
	207	165	81	10	23	31
Isoproturon-D6	213	78	77	10	31	15
	213	171	79	10	22	17
Diuron	233	72	70	10	38	13
	235	72	72	10	38	13
Diuron-D6	239	78	48	10	38	8
	240	78	51	10	35	8
Terbutryn	242	186	65	10	35	19
	242	158	58	10	34	31
Terbutryn-D5	247	191	89	10	32	9
	247	91	91	10	39	8
Cybutryn (Irgarol 1051)	254	198	83	10	30	22
	254	156	77	10	36	30
Cybutryn-D9 (Irgarol-D9)	263	199	87	10	29	14
	263	126	90	10	36	12
Tebuconazole	308	70	85	10	47	13
	308	125	81	10	51	12
Tebuconazole-D6	314	72	91	10	44	13
	314	125	57	10	54	23
Propiconazole	342	159	91	13	40	15
	342	69	34	7	37	13
Propiconazole-D5	347	159	74	10	42	9
	347	74	63	10	35	13
Mecoprop*	213	141	-65	-10	-22	-10
	213	71	-64	-10	-15	-10
Mecoprop-D3*	216	71	-65	-10	-15	-10
	216	144	-64	-10	-22	-10

HPLC-MS

For alle andre analyser hvor alene terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim har været målt, har der været anvendt HPLC-MS (high performance liquid chromatography with mass spectrometry) efter opkoncentrering på SPE (solid phase extraction). Vandprøver blev først filtreret gennem et 1,2 µm GF filter, hvorpå mellem 200 og 600 mL vand blev opkoncentreret ved SPE i et fuldautomatisk SPE system (Dionex Autotrace 280). Ekstraktionskolonnerne (cartridges) var Dionex Sol Ex Octadecyl C18, 6 mL, og ekstraktionsprogrammet var som følger: Konditionering af kolonnerne med 10 mL acetonitrile og 10 mL MiliQ vand, køre prøve gennem kolonnen, rens kolonnen med 10 mL MiliQ vand, tør kolonnen i 8 minutter, påfylde og opsamle med acetonitrile (4+3 mL), påfylde og opsamle med metanol (4+3 mL). Prøver med de laveste koncentrationer blev herefter inddampet til 1 mL med nitrogen gas. Prøverne blev herpå centrifugeret ved 11.000 rpm i 10 minutter, for at undgå partikler ved den efterfølgende injektion på HPLC'en.

HPLC-MS analysen brugte elektrospray ionisering i positiv modus (ESI(+)) på et Dionex Ultimate 3000 HPLC-system, koblet til et Thermo Scientific MSQ Plus single quadrupole Masse Spektrometer. Separationen blev udført ved 30°C på en Synergy polar-RP kolonne (L = 150 mm, ID = 2 mm, partikler = 4 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA). En flertrins gradient af vand med 0,1% myresyre (A) og acetonitrile med 0,1% myresyre (B) blev anvendt som følger: 0-1 min 30% B, 1-10 min 30-90% B, 10-14 min 90% B, 14-19 min, 30% B.

Sediment ekstraktion

I mikrokosmosforsøgene (afsnit 0) blev biocider ekstraheret fra sediment med "accelerated solvent extraction". 1 g sediment, blandet med 1,5 g Hydromatrix, og derpå ekstraheret med "solvent extraction" (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Overskydende plads i de 11 mL store celler blev fyldt med Ottawa sand. Cellerne blev ekstraheret ved 80°C og 1000 psi, ved brug af metanol (LiChrosolv gradient grade, Merck, Darmstadt, Germany) som opløsningsmiddel. Samlet blev der udført 2 ekstraktionscykler med følgende opsætning: Statisk tid 5 min, foropvarmning 1 min, skylning 60%, rensning 60%. Derpå den primære ekstraktion, 50 μL af en surrogat standard (1 μg mL 1 carbendazim-D4, diuron-D6, iodocarb-D9, isoproturon-D6, methylisothiazolinone-D3, octylisothiazolinone-D17, tebuconazole-D6, terbutryn-D5 in methanol) blev spiket til 1 mL ekstrakt. En solid phase ekstraktion blev udført som oprensning og prøven blev derpå analyseret på HPLC-MS/MS som beskrevet i afsnit 2.3.1.

2.3.2 Analyse af fosfor, kvælstof og klorofyl

Total fosfor blev målt i henhold til DS/EN ISO 6878:2004 (Dansk Standard, 2004). Opløst reaktivt fosfor blev målt efter Standard Methods 2500-P (APHA, AWWA, WEF, 2012). Nitrat + nitrit nitrogen blev målt efter DS 223 (Dansk Standard, 1991). Vandprøver for opløst fosfor og nitrit + nitrat nitrogen blev filtreret gennem 0,3 µm glasfiber filtre før analyse. Klorofyl-a blev ekstraheret i acetone og målt spektrofotometrisk. Vandprøver blev filtreret gennem et 0,7 µm Ø47 mm GF/F filter. Efter filtrering blev filtreret neddelt i mindre stykker, og macere-ret/ekstraheret i 90% acetone for 20 minutter i mørke. Filter og acetone blev så centrifugeret i 10 minutter ved 2500 rpm. Klorofyl-a koncentrationen blev derpå beregnet ud fra forskellen i absorbans ved 664 og 750 nm.

2.4 Biologiske analysemetoder

2.4.1 Bentiske diatoméer i sedimenter

Diatoméer i sediment fra regnvandssøer blev bestemt i henhold til "den varme 30% brintoverilte metode" (Taylor et al., 2007; Kelly, 2000; DARES, 2004). Efter behandling i minimum 5 timer, blev overskydende brintoverilte vasket af sedimentet ved centrifugering og resuspension i demineraliseret vand. 1,5 mL af den behandlede og vaskede prøve blev fordelt på mikroskopi dækglas, der først var vasket i salpetersyre for at minimere at diatoméer klumper sammen. Derpå blev dækglasset tørret og limet fast til et objektglas med Naphrax (Brunel Microscopes Ltd).

Diatoméer blev bestemt til slægt niveau ved brug af bøger og databaser som identifikationsnøgler (Kelly, 2000; Spaulding et al., 2010). Der blev talt mindst 300 diatomé-skaller i tilfældigt udvalgte felter ved brug af et 1000x forstørrelse lysmikroskop med olie immersion.

2.4.2 Fytoplankton

Identifikation og kvantificering af fytoplankton blev udført med inverteret mikroskop (EVOS XL-Core og GX Optical XDS-3) og analyseret i enten HydroBios eller KC-Denmark sedimentationskamre for fytoplankton. Afhængig af hvor meget fytoplankton der var i en prøve, blev der valgt sedimentationskamre på 5 eller 10 mL. For nogle af fytoplantonprøverne blev der endvidere benyttet større kamre (25, 50, 100 mL), hvor selve tællekamret var 2,973 mL. Om nødvendigt blev der lavet fortyndinger af fytoplankton prøven før placering i sedimentationskamer.

For identifikation af fytoplankton til undersøgelse af fytoplanktonsamfunds respons på biocidpåvirkning (afsnit 0), blev fytoplankton taksonomisk identificeret til slægtsniveau. Hvis dette ikke var muligt, blev den enkelte organisme kategoriseret på et højere taksonomisk niveau, så som familie, klasse, række eller kategoriseret i en gruppe af ikke-identificerede organismer. Trådformede grønne alger blev ikke inkluderet i identifikation og kvantificering. For identifikation af fytoplankton til undersøgelse af fytoplanktonsamfund i regnvandsbassiner (afsnit 0) blev organismerne om muligt identificeret til artsniveau.

Tælling blev udført enten for hele kammeret ved 100x forstørrelse for at bestemme de større organismer, og i transekter ved 400x forstørrelse for at tælle de mindre organismer. Endvidere blev 600x forstørrelse brugt til at identificere og tælle de mindste organismer. Enkelte celler, kolonier og filamenter blev betragtet som tælle-enheder. Ifølge teknisk anvisning udarbejdet af Lauridsen et al. (2005), skal det "undersøges hvilke arter/slægter, der kvalitativt er de vigtigst i prøven. De talte arters volumen skal skønnes at udgøre mindst 90% af det totale volumen". I nærvende arbejde blev det valgt at tælle og kvantificere 95% af hele prøven. Taxa blev bestemt ved brug af bøger og databaser som identifikationsnøgler (John et al., 2011; Cronberg and Annadotter, 2006; Nygaard, 2001; Algaebase, 2016). Biovolumen blev estimeret for hver taxa eller gruppe af organismer ved at tildele dem en geometrisk form, som beskrevet i Hillebrand et al. (1999) og Lauridsen et al. (2005).

2.5 Fytoplankton og bentiske diatoméer i regnvandssøer

2.5.1 Bentiske diatoméer

Der blev udtaget prøver fra 10 regnvandssøer i august 2014, hvoraf den ene mislykkedes i analysen. Der indgik dermed 9 søer i undersøgelsen (Tabel 2). Disse dækkede forskellige arealanvendelser kategoriseret som motorvej, beboelse, industri, samt blandet bolig og industri (Figur 3, Tabel 1). Sedimentprøver blev taget 5 steder i en sø, jævnt fordelt i søens periferi. Et eksempel herpå er vist i Figur 4 for regnvandssø B2 (Figur 3, Tabel 1). Vandkvalitetsparametrene pH, opløst ilt, ledningsevne, temperatur, nitrit+nitrat, total fosfor og chlorophyll-a blev målt jævnfør afsnit 2.3.2 samtidigt med, at sedimenterne blev hentet. Det skal bemærkes, at der er meget stor tidslig variation i disse parametre, og de derfor alene kan give et groft fingerpeg om søens tilstand (Wium-Andersen et al., 2013). Disse analyser er derfor ikke medtaget i den videre analyse af diatomé-samfundene.



Figur 4 Eksempel på fordeling af prøvetagningssteder i en sø (B2, Tabel 1)

Sedimentprøver blev optaget med Ø50 mm prøverør. Prøvetagningen skete fra kajak for at undgå at forstyrre sedimentet (Figur 5). Prøverne blev taget på en dybde af cirka 0,7 m. Den øverste centimeter blev ekstraheret på stedet, hvor den blev konserveret i etanol (slutkoncentration på 20%) og gemt koldt og mørkt til videre analyse på laboratoriet. Begrundelsen for at udtage den første centimeter af sedimentet var, at sedimentdannelsen i en gennemsnitlig regnvandssø er i størrelsesordenen 1 cm år⁻¹, og den øverste centimeter derfor i runde tal dækker et års historik i søen (Yousef et al., 1994). Hver sedimentprøve blev grundigt blandet og 3 ml udtaget af hver af de 5 prøver for videre behandling.



Figur 5 Sedimentprøvetagning med kernetager udført fra båd

2.5.2 Fytoplankton

Vandprøver for bestemmelse af sammensætningen af fytoplanktonsamfund blev udtaget i perioden 12. – 21. august 2014. For ikke at forstyrre vandsøjlen og kontaminere prøven med sediment, blev vandprøven taget fra kajak som illustreret i Figur 5. Der blev udtaget i alt 5 prøver jævnt fordelt i søen, hvor der per prøve blev udtaget 1 L vand på 20 cm dybde. Fytoplanktonprøver blev konserveret med Lugol's jod opløsning til senere identifikation og kvantificering.

Samtidigt blev der udtaget 1 L vand på hvert af de 5 prøvetagningssteder til kemisk analyse. Disse 5x1 L søvand blev blandet og efterfølgende blev blandeprøven analyseret for total-N, total-P samt klorofyl-a jf. afsnit 2.3.2. Alle prøver blev lagret mørkt og koldt umiddelbart efter prøvetagningen og transporteret til laboratoriet. Senest 24 timer efter prøvetagningen blev prøverne analyseret eller konserveret for senere analyse. Vandkvalitetsparametrene opløst ilt, pH, konduktivitet og temperatur blev målt ved prøvetagningen med et WTW MultiLine[®] 3430 håndholdt multimeter.

Biocider blev målt på 3 tidspunkter per sø, hvor den første prøvetagning skete samtidigt med fytoplanktonprøvetagningen, og de efterfølgende skete med 3-4 ugers interval herefter. Prøverne blev gemt mørkt og koldt til de blev analyseret med HPLC-MS/MS jf. afsnit 2.3.1.

2.5.3 Statistisk behandling af alge data

Regnvandssøer blev karakteriseret efter oplandstype og de målte middelkoncentrationer af biocider sammenlignet ved one-way ANOVA i programmet SigmaPlot 12.3. Idet der kun var ét bassin indenfor oplandstypekategorien "blandet industri og bolig" (sø BI, Figur 3), blev denne oplandstype udeladt fra analysen. Hvor der var signifikante forskelle mellem søerne, blev der udført parvis posthoc sammenligning mellem grupper ved brug af Tukey's eller Dunn's metode. Førstnævnte for normalfordelte data og sidstnævnte for ikke-normalfordelte data.

Ligheder mellem de 5 prøvetagningssteder i hver sø blev analyseret med "Bray-Curtis similarity indices" i programmet Past v. 3, hvor et similaritetsindeks på 0 betyder ingen similaritet og 1 betyder fuldstændig similaritet. Forskelle i den taxonomiske sammensætningen af diatomé- og fytoplanktonsamfund mellem de 3 oplandstyper blev testet ved ANOSIM test i programmet Primer v. 7. Her blev sø BI ligeledes udeladt med samme begrundelse som ovenfor. Mulige grupperinger af søerne i forhold til deres diatoméer og fytoplanktonsamfund blev testet med "Classical Bray-Curtis Cluster analysis" og detrended correspondence analysis (DCA), begge i programmet Past v. 3. Det blev endvidere undersøgt, hvorvidt non-metric multidimensional scaling (NMDS) afveg fra DCA, idet der kan være diskussion om hvilken metode, der er den bedst egnede til formålet. I alle tilfælde viste de to metoder sig at give sammenligneligt resultat, og det blev derfor valgt kun at præsentere DCA-analyserne.

Korrelation mellem parametre der karakteriserer søerne, dvs. areal, middeldybde, hydraulisk opholdstid samt målte biocidkoncentrationer blev sammenholdt med taksiometriske diatomé- og fytoplanktondata ved hjælp af Spearman's rank-korrelation i programmet Past v. 3.

Alle statistiske analyser er udført på log-transformerede data med henblik på at tilnærme en normalfordeling.

2.6 Fytoplanktonsamfunds respons på biocidpåvirkning

De akvatiske samfund i en regnvandssø påvirkes af meget andet end biocider i regnafstrømningen, hvilket kan gøre det vanskeligt at identificere en klar årsags-virkningssammenhæng mellem biocidpåvirkning og effekt. For at komme nærmere på hvorvidt fytoplanktonsamfundene påvirkes af biocider i miljørealistiske koncentrationer, er der udført dosis-respons forsøg i mikro- og mesokosmer, hvor der opnås en øget kontrol med de biologiske elementer og kemiske forhold.

Der er udført 3 typer forsøg, der dækker over forskellige grader af biologisk kompleksitet:

- Mikrokosmer der alene indeholder vandfasen fra en regnvandssø og som inkuberes under kontrollerede forhold i laboratoriet
- Mikrokosmer der indeholder vandfasen såvel som sedimentfasen fra en regnvandssø og som inkuberes under kontrollerede forhold i laboratoriet
- Mesokosmer placeret i en regnvandssø og som inkuberes i denne under naturlige forhold

Alle tre typer forsøg blev udført på vand og sediment fra sø B1 (Figur 3, Tabel 1). I alle tre undersøgelser blev der spiket med biociderne terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim (afsnit 2.2). Biociderne blev indkøbt fra Sigma-Aldrich som pulver (Pestanal®, analytisk standard). Stamopløsninger blev lavet i acetonitril for hver substans, såvel som en blanding af alle 4 substanser, og gemt på frost indtil brug.

2.6.1 Mikrokosmer med vandfase alene

Vandet til mikrokosmosforsøg med vandfasen alene blev udtaget som blandeprøver fra et større antal stikprøver jævnt fordelt langs søens bred. Vandprøverne blev udtaget den 12 april 2015 fra kajak som beskrevet for diatomé-prøvetagning i afsnit 2.4.1. Det opsamlede vand blev blandet i én beholder, hvorfra 18 mikrokosmer (glasflasker á 1 L) blev fyldt. Flaskerne blev hjembragt til laboratoriet og en passende mængde stamopløsning blev tilsat. Slutkoncentrationer på 10, 100 og 1000 ng L⁻¹ af de enkelte biocider blev tilstræbt i såvel de kosmer, der kun havde et enkelt biocid, som de kosmer, der havde en blanding af biocider. Ud over disse 15 flasker med biocider, blev 3 flasker brugt som kontrol. Alle 18 flasker blev suppleret med acetonitril til en slutkoncentration på 0,01%. Intervallet af biocidkoncentrationer blev valgt så det dækker miljørealistiske koncentrationer. I forhold til hvad der tidligere har været fundet i afstrømmet regnvand, svarer koncentrationerne til et spænd fra moderate koncentrationer, der svarer til middelkoncentrationer i regnvandssøer, til høje koncentrationer, der af og til forekommer. Acetonetril var nødvendigt i forsøgene for at kunne opløse og tilsætte biociderne til vandet. For at have ens betingelser, blev acetonitril suppleret op til samme koncentration i alle forsøg. Acetonetril er kun moderat toksisk med en PNEC der er 10 gange lavere end den anvendte koncentration.

Mikrokosmerne blev placeret i et mørkt kælderrum i et stativ med vækstlys fra siderne (Figur 6). Kosmerne (flaskerne) blev anbragt i to parallelle rækker i stativet og belyst fra siden med LED vækstlamper bestående af et antal røde og hvide dioder (254 W m⁻² henholdsvis 342 W m⁻²). Lysenergien som flaskerne modtog, blev målt med et fiber-optisk spektrometer (USB2000+, Ocean Optics, USA) og en lys-mørke cyklus på 12 timer blev programmeret. Fosøget løb over 10 døgn. Temperaturen og den relative fugtighed i rummet blev logget til en middel på 18,7°C (varierende fra 17 til 21°C) og 55-74% luftfugtighed.





Figur 6 Kælderrum til mikrokosmer, mikrokosmer stativ med vækstlys fra siderne

Mikrokosmerne stod åbne under hele forsøget, uden at der blev observeret nogen fordampning af betydning. For at sikre at mikrokosmerne modtog så ens en belysning som muligt, blev de roteret i opstillingen en gang dagligt. Samtidigt blev mikrokosmerne omrystet for at minimerer bundfald i flaskerne. På trods heraf kunne fastsiddende alger i bunden af flaskerne ikke helt undgås.

Der blev udtaget prøver til bestemmelse af fytoplanktonsamfund før tilsætning af biocider (dag 0), 1 døgn efter biocid tilsætningen, efter 5 døgn og efter 10 døgn. Heraf blev alene dag 0 og dag 10 efterfølgende analyseret for fytoplanktonsamfund. Til denne analyse blev der udtaget 40 ml vand fra hvert mikrokosmos, og præserveret i lugol opløsning. Prøverne blev lagret koldt og mørkt til analyse med lysmikroskop jævnfør afsnit 2.4.2.

Initiale koncentrationer af biociderne terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim (afsnit 2.3.1, HPLC-MS), såvel som total fosfor, opløst reaktivt fosfor, nitrat+nitrit og klorofyl-a (afsnit 2.3.2) blev målt på blandeprøven fra sø B1 før forsøget start, samt på vand fra hvert enkelt mikrokosmos ved forsøgets slut.

2.6.2 Mikrokosmer med vandfase og sediment

Sedimentkerner på 5 cm diameter blev optaget med kernerør af glas (Figur 7) den 22. april 2015, lukket i bunden med prop og placeret i den samme opstilling som beskrevet i afsnittet om mikrokosmer med vandfase alene (afsnit 2.6.1). Rørene blev udtaget fra kajak fra sø B1 som beskrevet for diatomé-analyse (afsnit 2.4.1).

Sedimentkernerne fyldte ikke lige meget i alle kernerør, og vand blev derfor dekanteret, så der stod 25 cm vand over sedimentet i alle prøvetagningsrør. Vandmængden over sedimentkernen blev beregnet og der blev tilsat biocider til startkoncentrationer i vandfasen på 10, 100 og 1000 ng L⁻¹ af de enkelte biocider i såvel de kosmer, der kun havde et enkelt biocid, som de kosmer, der havde en blanding af biocider. Ud over disse 15 kernerør med biocider, blev 3 kernerør brugt som kontrol. Alle 18 kernerør blev suppleret med acetonitril til en slutkoncentration på

0,01%. Herefter blev de hensat i opstillingen med LED vækstlys og udsat for en 12-timers lysmørke cyklus (Figur 8). Middeltemperaturen i rummet var 19°C (varierende fra 18 til 25°C) og den relative luftfugtighed var 48-76,5%.



Figur 7 Udtagning af sedimentprøver med prøverør af glas, indstilling af vandspejl

Mikrokosmerne stod åbne under hele forsøget, uden at der blev observeret nogen fordampning af betydning. Vandfasen blev dagligt omrørt med en glasspatel. Der blev udtaget prøver til bestemmelse af fytoplanktonsamfund før tilsætning af biocider (dag 0), 1 døgn efter biocid tilsætning, efter 5 døgn samt efter 10 døgn. Heraf blev alene dag 0 og dag 10 efterfølgende analyseret for fytoplanktonsamfund. Til denne analyse blev der udtaget 20 ml vand fra hvert mikrokosoms, der blev konserveret i lugol opløsning. Prøverne blev lagret koldt og mørkt til analyse med lysmikroskop jævnfør afsnit 2.4.2.





Figur 8 Mikrokosmosforsøg med sediment

Initiale koncentrationer af biociderne terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim (afsnit 2.3.1, HPLC-MS), såvel som total fosfor, opløst reaktivt fosfor, nitrat+nitrit og klorofyl-a (afsnit 2.3.2) blev målt på en blandeprøve udtaget fra sø B1 før forsøget start, samt på vand fra hvert enkelt mikrokosmos ved forsøgets slut.

2.6.3 Mesokosmer i en regnvandssø

I august 2015 blev 10 områder af søbunden i B1 indkapslet ved at nedsætte stålringe påmonteret en klar plastikskærm (Ø500 mm) i søbunden. Mesokosmernes stålring blev presset ned i sedimentet, så cirka 20 cm af den transparente plastikskærm var over vandspejlet. Dette sikrede, at der ikke skete udveksling af organismer og vand mellem søen og de enkelte mesokosmer når vandstanden i søen varierede på grund af regnafstrømning. Vandstanden i søen blev kontinuerligt logget med en vandstandsmåler for at dokumentere, at mesokosmerne ikke blev oversvømmet under regnhændelser. Der blev placeret 5 mesokosmer i den østlige side af søen og 5 i den vestlige side.

Efter at søljerne var placeret i søen henstod mesokosmerne i 3 dage før biocider blev tilsat. I hver side blev 1 af de 5 fem kosmer kørt som blank uden biocidtilsætning. Til de andre blev der tilsat terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim til 100 og 1000 ng L⁻¹. Til alle mesokosmer, også de blanke, blev der tilsat acetonitril til en koncentration af 0,01%. Forsøget kørte over 15 døgn, startende den 7. august. I forsøgsperioden var den gennemsnitlige lufttemperatur 17°C og der var klar solskin mellem 2 og 14 timer per dag. Det regnede 3 af dagene, hvor der tilsammen faldt 16,4 mm nedbør, fordelt på nogle mindre hændelser og én større hændelse den 15. august om morgenen (Figur 10). I måneden forud for måleperioden faldt der samlet 73,2 mm nedbør. Heraf kom den sidste, større hændelse den 4. august, hvor der samlet faldt 9,8 mm.





Figur 9 Mesokosmerne og placering heraf i søen

Efter at søljerne var placeret i søen henstod mesokosmerne i 3 dage før biocider blev tilsat. I hver side blev 1 af de 5 fem kosmer kørt som blank uden biocidtilsætning. Til de andre blev der tilsat terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim til 100 og 1000 ng L⁻¹. Til alle mesokosmer, også de blanke, blev der tilsat acetonitril til en koncentration af 0,01%. Forsøget kørte over 15 døgn, startende den 7. august. I forsøgsperioden var den gennemsnitlige lufttemperatur 17°C og der var klar solskin mellem 2 og 14 timer per dag. Det regnede 3 af dagene, hvor der tilsammen faldt 16,4 mm nedbør, fordelt på nogle mindre hændelser og én større hændelse den 15. august om morgenen (Figur 10). I måneden forud for måleperioden faldt der samlet 73,2 mm nedbør. Heraf kom den sidste, større hændelse den 4. august, hvor der samlet faldt 9,8 mm.



Figur 10 Nedbørsrelateret afstrømning til regnvandssø B1 i perioden 1. juli 2015 til 27. august 2015

Samtidigt med biociddoseringen blev der udtaget 1 L vand fra hvert mesokosmos samt fra søen udenfor kosmerne. Herefter blev der udtaget 1 L vand hver 3. døgn. Før prøvetagning blev hvert kosmos omrørt med lange glasstænger. Delprøver på 40 ml blev udtaget fra 1-liter prøven til fytoplanktonkarakterisering og kvantificering og konserveret i lugol opløsning på dag 0, 3, 9 og 15. Heraf blev kun mesokosmosprøverne fra dag 15 samt søprøver fra dag 0 og 15 efterfølgende analysereret for fytoplanktonsammensætning.

På den resterende del af vandprøverne blev der på dag 0, 9 og 15 målt biociderne terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim (afsnit 2.3.1, HPLC-MS), såvel som total fosfor, opløst reaktivt fosfor, nitrat+nitrit og klorofyl-a (afsnit 2.3.2). På samtlige prøvetagningsdage blev der med håndholdt multimeter (WTW, Multi 3430 set G) målt konduktivitet, pH, opløst ilt og temperatur i såvel hvert mesokosmos som i selve søen.

2.7 Nedbrydning af biocider i urbane småsøer

2.7.1 Prøvetagningssteder og sedimentekstraktion

Sediment blev hentet fra 6 regnvandssøer, udvalgt så deres opland dækker tre forskellige arealanvendelser og dermed forventet biocidanvendelse, nemlig motorveje, industriområder og beboelseskvarterer (Tabel 1 og Tabel 2). I hver sø blev sedimentet udtaget som sedimentkerner fra 3 forskellige steder i søen, tæt på indløbet og på en dybde af 0,3 - 0,5 m (Figur 5). Kernetageren havde en indre diameter på 5 cm og var fastgjort til en stang. De øverste 5 cm af kernerne blev hjemtaget og brugt til forsøgene. Prøver til bestemmelse af sorptionskapacitet og -kinetik (afsnit 2.7.2 og 2.7.3) blev taget i perioden juni til oktober 2014. Prøver til bestemmelse af nedbrydning af biocider i sediment mikrokosmer blev taget i perioden 18. til 24. november 2014.

2.7.2 Sorptionskapacitet

Hvor

Der blev målt sorptionskapacitet i batch forsøg for terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim for sedimenter fra de 6 regnvandssøer (Tabel 2). Biociderne blev analyseret med HPLC-MS/MS jf. afsnit 2.3.1. For hver sø blev der lavet 3 suspensioner af 90 g vådt sediment i 450 mL vand hentet fra samme sø som sedimentet. Der blev derpå tilsat henholdsvis 25, 50, og 100 µg L⁻¹ til de 3 suspensioner. Biocidstartkoncentrationer blev målt før tilsætning af sediment. Forsøgene varede 24 timer og blev udført ved stuetemperatur (cirka 22°C). Det blev valgt ikke at tilsætte buffer til suspensionerne, dels fordi den øgede ionstyrke påvirker sorptionskapaciteten (f.eks. Delle Site, 2001) og dels fordi formålet med forsøgene var at kvalificere nedbrydningsforsøgene præsenteret i afsnit 0. I sidstnævnte forsøg var det problematisk at bufre, da forsøgenes formål var at efterligne nedbrydning i naturligt sediment. Resultaterne blev efterfølgende simuleret som en Freundlich isoterm (Ligning 1).

$C_s = K_f C_e^{\frac{1}{n}}$	(Ligning 1)
Cs	koncentration af biocid bundet til sediment [µg gTS ⁻¹]
Ce	koncentration af biocid i vandfasen [µg L ⁻¹]
K _f	Freundlich isoterm konstant
n	Freundlich isoterm konstant

2.7.3 Sorptionskinetik i sedimentsuspensioner

For én prøve fra hver sø blev der endvidere målt kinetik under sorptionsforsøgene. Dette blev gjort ved at suspendere 90 g vådt sediment i cirka 800 mL vand udtaget fra samme sø som sedimentet. Derpå blev der tilsat en blanding af terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim til koncentrationer på ca. 100 μ g L⁻¹ for terbutryn, diuron og carbendazim og ca. 50 μ g L⁻¹ for cybutryne (irgarol 1051). Biocid startkoncentrationer blev målt før tilsætning af sediment. Forsøgene blev holdt i suspension, og til tiderne 0, 0,25, 1, 3 og 24 time blev der udtaget ca. 150 mL suspension til biocidanalyse. Forsøgene blev kørt uden buffer med samme begrundelse som givet i afsnit 2.7.2.

2.7.4 Nedbrydning af biocider i sediment mikrokosmer

For hvert af de 6 søer blev der endvidere udtaget sediment til nedbrydningsforsøg. Forsøgene blev udført i mikrokosmer, hvor 500 g vådt sediment og 3 L søvand blev placeret i glasbeholdere med 15,5 cm bunddiameter. Beholderne blev pakket ind i lys-uigennemtrængeligt materiale og termostateret til 10°C. Fire gange dagligt blev der forsigtigt blæst luft ind på vandoverfladen for at sikre, at vandfasen havde en iltkoncentration over 60% af mætning. pH blev kontrolleret men ikke justeret.

Herpå henstod kosmerne i 10 dage for at tillade sedimentet at konsolidere (Figur 11). De 6 sedimenter dannede et knapt 3 cm tykt lag med nogen variation, da graden af konsolidering varierede og sedimenterne havde forskellig våddensitet. På tiendedagen blev der tilsat biocider. Terbutryn, diuron og carbendazim blev tilsat til en vandfase startkoncentration på cirka 100 μ g L⁻¹ mens cybutryne (irgarol 1051) blev tilsat til cirka 50 μ g L⁻¹.

Der blev til tiden 0 samt efter 1, 2, 3, 7, 13 og 21 dage udtaget 150 mL prøve til biocidanalyse med HPLC-MS/MS jf. afsnit 2.3.1. Herpå blev reaktorerne dekanteret og sedimentet frysetørret. Det frysetørrede sediment blev ekstraheret ved "accelerated solvent extraction" jf. afsnit 2.3.1, og derpå analyseret for biocider med HPLC-MS/MS jf. afsnit 2.3.1.





Før mikrokosmosforsøgene blev udført, blev der gennemført et indledende forsøg for at se, om biociddosering havde en akut hæmmende effekt på sedimentets aerobe respirationsrate. En sedimentprøve blev placeret i et respirometer, hvor prøven blev hold i suspension gennem omrøring. Respirometret fungerer ved, at prøven bliver beluftet, reaktoren lukket, og respirationsraten målt i vandfasen til iltkoncentrationen nåede et valgt setpunkt. Derpå blev proceduren gentaget. Figur 12 viser et eksempel på de gennemførte tests, hvor der først blev tilsat biocid til en vandfase koncentration på 1 μ g L⁻¹ og derpå til 10 og 100 μ g L⁻¹. Forsøgene blev udført både med biociderne individuelt og med biociderne som cocktail. I sidstnævnte tilfælde var der 1, 10, og 100 μ g L⁻¹ af hvert af biociderne i reaktoren. Da ingen af forsøgene viste nogen form for respirationshæmning, blev der valgt en maksimal startkoncentration af biocider i mikrokosmerne på 100 μ g L⁻¹.



Figur 12 Test af iltrespirationshæmning ved biocid dosering. Pilene indikerer dosering af biocid til reaktoren

2.7.5 Nedbrydning af biocider i fytoplanktonmesokosmer

I forbindelse med undersøgelse af fytoplanktonbiodiversitet, blev der udført mesokosmosforsøg i én af regnvandssøerne (B1, Tabel 1). Forsøgene er nærmere beskrevet i afsnit 2.6.3. I disse forsøg blev der doseret terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim til kosmerne til koncentrationer på 0, 100, og 1000 ng L⁻¹, og der blev målt biocid over en periode på 21 døgn. Der blev udtaget cirka 150 mL vandfase hertil og prøverne blev analyseret med HPLC-MS som beskrevet i afsnit 2.3.1. Der blev ikke målt på sedimentet hverken før eller efter forsø-get.

2.7.6 Tidslig udvikling af biocidkoncentration i en sø

Den tidslige udvikling i biocidkoncentration blev fulgt i sø B1 (Tabel 1). Undersøgelsen startede den 11. november 2015 og blev afsluttet den 9. januar 2016. Prøverne blev udtaget tidsproportionalt med en ISCO prøvetager og opsamlet i glasflasker. Prøvetageren var placeret i et underjordisk indløbsbygværk designet til prøvetagning (Figur 13). Sugeslangen til prøvetageren var ført frostsikkert ud til selve søen og placeret et par meter ude i denne. Hver 12. time tog prøvetageren 175 mL. Seks delprøver blev samlet til en blandeprøve, der efterfølgende blev analyseret med HPLC-MS/MS jf. afsnit 2.3.1.

Vandføringen til søen blev målt kontinuerligt med en fuldtløbende flowmåler (Krone optiflux) og nedbørsdata blev hentet fra en nærliggende SVK-regnmåler (SVK station 5190 cirka 2 km fra oplandet til søen).


Figur 13 Prøvetagning ved sø B1. Prøvetageren er placeret i et underjordisk bygværk og suger fra selve søen et par meter ude i vandet

2.7.7 Simulering af biocidnedbrydning i sediment mikrokosmer

Forsøgene beskrevet i afsnit 0 blev simuleret med en model, der beskriver transporten fra en fuldt opblandet vandfase, gennem en stillestående vandfilm på sedimentoverfladen og ned i sedimentet. Modellen er en 1-dimensionel boksmodel, hvor transporten i vandfilmen og sedimentet er beskrevet ved Ficks diffusion (Figur 14). Inde i sedimentet sorberer biociderne efter en Freundlich isoterm (Ligning 1) med de konstanter, der blev bestemt i sorptionsforsøgene (2.7.2). Sorptionskinetikken er beskrevet som en første ordens proces i den til enhver tid resterende sorptionskapacitet. Nedbrydningen af biocider er simuleret som en første ordens proces i sedimentets tørstofkoncentration og en nulte ordens proces i den opløste biocidkoncentration (Ligning 2).

Totalt opblandet vandfase
······································
Stillestående vandfilm
Cadimanatan
Sedimenter
Diffusion af biocider
Sorption af biocider til sedimenter
Nedbrydning af biocider

Figur 14 Princip for sedimentmodel

$$\frac{dC_{BC}}{dt} = k_{BC} X_{TS}^1 C_{BC}^0$$

Ligning 2

Hvor	C_{BC}	Biocidkoncentration [µg L ⁻¹]
	K_{BC}	Ratekonstant for biologisk omsætning [µg BC s ⁻¹ TS ⁻¹]
	X _{TS}	Tørstofkoncentration [g TS L ⁻¹]
	t	tid [s]

2.8 Sorption og omsætning til filterjord

Sorption og fjernelse af biocider blev undersøgt ved brug af jordfiltre tilsat forskellige mængder af organisk stof. Tre glas søjler (LC Tech, Dorfen, Tyskland, 500 x 40 x 25 mm) blev etableret med filter materiale bestående af kvartssand (partikel størrelse på 50-70 µm) tilsat henholdsvis 0%, 0,5% og 1% organisk stof (spagnum). Forud for forsøgene blev søjlerne skyllet med renset spildevand i 2-3 måneder for at sikre biologisk aktive overflader (Figur 15). Det rensede spildevand blev filtreret og beluftet før det blev ført ind på søjlerne.



Figur 15 Jordfilter opsætning med glas søjler påfyldt kvartssand tilsat organisk stof i form af spagnum som filter materiale. Tilførsel af filtreret og beluftet renset spildevand

Spagnum blev valgt som organisk stof idet spagnum ofte anvendes til berigelse af sand til filterjord anvendt i filtersystemer til rensning af afstrømmet regnvand. Ni repræsentative biocider blev valgt til denne undersøgelse, nemlig methylisothiazolinone, benzisothiazolinone, octylisothiazolinone, diuron, isoproturon, terbutryn, tebuconazole, propiconazole og mecoprop.

2.8.1 Sorption af biocider til filterjord

Grundstammen i opstillingen for sorptionsforsøgene var to parallelt koblede HPLC-systemer, forbundet med en 6-ports ventil, der tilførte prøve til den ene af HPLC'erne (Figur 16). HPLC'erne var Ultimate 3000 dual-gradient lavtryks systemer (ThermoFisher) udstyret med en multibølgelængde UV-vis detektor. Under sorptionsforsøgene blev jordfiltersøjlerne konstant fødet med Millipore-vand for at reducere baggrundsstøj. Tilførslen af Millipore-vand skete med en flowrate på 250 μ L min⁻¹. 100 μ L af en tracer (NaBr) eller standarder med et enkelt biocid (1 mg mL⁻¹ i metanol) blev injiceret ved brug af HPLC-systemets autosampler. Derpå blev udløbet fra jordfiltersøjlerne analyseret hvert 25'ende minut ved automatisk at overføre 100 μ L af udløbet fra jordfiltersøjlerne direkte til den analytiske kolonne på HPLC'en (Phenomenex Synergy Polar-RP kolonne, L=150 mm, ID=2 mm, partikler=4 μ m). Den kromatografiske separation skete ved brug af en flertrinsgradient bestående af vand (A) og metanol (B) ved 5°C med en flowrate på 250 μ L min⁻¹: 0-3 min 0% B, 3-5 min 0-50% B, 5-15 min 50-80% B, 15-15.5 min 80-100% B, 15.5-19 min 100% B, 19-20 min 100-0% B, 20-25 min 0% B. Herved kunne der opnås en elueringsprofil med høj opløselig.



Figur 16 Skitse af forsøgsopstilling for sorptioneksperimenter

2.8.2 Omsætning af biocider til filterjord

Fjernelse af biocider og dennes afhængighed af indholdet af organisk stof i filtermediet samt hydraulisk overfladebelastning af filtrene blev undersøgt i en opsætning svarende til den der er vist i Figur 15. Renset spildevand tilsat biocider (200 ng L⁻¹ i beluftet vand ved 4°C) blev konstant pumpet gennem søjlen med en MCP-CPF procespumpe (Ismatec, Wertheim, Germany). Flowraten varierede mellem 20 og 250 μ L min⁻¹. Udløbet blev opsamlet og analyseret jf. afsnit 2.3.1 med SPE ekstraktion og analyse på HPLC-MS/MS.

2.9 Simulering af regnvandssøer

Formålet med modellen er at udvikle et værktøj, der kan kvantificere samspillet mellem biocider i afstrømmet regnvand og urbane regnvandssøer, såvel som de bynære vandsystemer, som disse leder ud til. Frigivelsen af biocider fra byoverfladerne, såvel som biociders skæbne i urbane regnvandssøer varierer meget over tid, og det er derfor relevant at udvikle en fuldt dynamisk beskrivelse, der kan simulere lange tidsserier af frigivelse, skæbne og effekt.

Modellen består i hovedtræk af to elementer: En delmodel for byoverfladen og en delmodel for regnvandssøen. Modellens hovedtræk er vist i Figur 17. Regnvand fra byoverfladerne strømmer til søen under regn, og medtager biocider i varierende koncentration. Vandet med biociderne opblandes i søvandet, hvorved biocidindholdet udjævnes. Udløbet fra søen er hydraulisk begrænset og regnvand (søvand) løber derfor ud under regnhændelsen såvel som et stykke tid herefter. Som årsgennemsnit vil der være tilløb af overfladeafstrømning til en regnvandssø cirka 5% af tiden, svarende til hvor stor en andel af året det regner i Danmark. Biociderne i søvandet vil interagere med sedimentet. Når biocidkoncentrationerne i vandfasen er høje i forhold til hvad der er bundet i sedimentet, vil biocider diffundere ned i sedimentet og undergå omsætning. Når der kommer vand til søen med lavere biocidkoncentrationer, kan desorption og diffusion ud i sedimentet forekomme. Sedimentet vil derfor dels fjerne biocider permanent fra vandfasen og dels udligne koncentrationen i vandfasen ved skiftevis at sorbere og desorbere biocider.

Delmodellen for byoverfladen beskriver, hvordan nedbør udvasker biocider fra overfladebehandlede facader, og transportere dem med det afstrømmende regnvand gennem byens separate afløbssystem. Beskrivelsen er fuldt dynamisk og benytter målte historiske regnserier som indgangsparametre. På denne basis genererer modellen en tidsserie for vandføring samt biocidkoncentrationer i udløbet fra afløbssystemet. Tidsseriens opløsning er et minut, svarende til opløsningen af den anvendte historiske regnserie. Modellen benytter en Monte Carlo simuleringsstrategi, hvor der trækkes en ny biocidkoncentration for hver regnhændelse. Værdien trækkes fra en lognormalfordeling, svarende til hvad der blev fundet i Bester et al. (2014).



Figur 17 Modelkoncept for simulering af biocider i regnvandssøer

Delmodellen for regnvandsøen benytter tidsserien fra delmodellen for overladeafstrømning som øvre rand for afstrømning og biocider. Som den hydrauliske nedre rand benytter delmodellen søens udløb, der styres af udløbskonstruktionens hydrauliske kapacitet. Endvidere kan modellen medtage fordampning, nedbør på selve vandoverfladen, indsivning af grundvand (fra såvel afstrømningsoplandet som jorden der omgiver søen), samt udsivning fra søen ifald grundvandspejlet ligger laverer end søens vandspejl. Modellen arbejder med tidsskridt på 1 minut, altså tilsvarende modellen for byoverfladen.

2.9.1 Den simplificerede biocidmodel

Nedbrydning af biocider i søen simuleres med en model for sorption af biocider til sedimentet, desorption fra sedimentet samt nedbrydning i sedimentet. Beskrivelse af sorption, desorption og nedbrygning er baseret på de resultater, der er opnået fra simulering af forsøgene med biocidnedbrydning (afsnit 2.7.7). Modelen der blev præsenteret i det afsnit er kompliceret og særdeles beregningstung. For at kunne benyttes i en model der regner over år, skal den simplificeres.

Den simplificerede model håndterer sedimentet som et fuldt opblandet system, der interagerer med en fuldt opblandet vandfase. Modellen består af et kinetikled, der beskriver kinetikken i transporten mellem vandfasen og sedimentfasen (Ligning 3). Ledet tillader transport af biocid såvel ind i som ud af sedimentet, afhængig af de konkrete koncentrationer af biocid i sedimentet og biocid i den overliggende vandfase. Dertil kommer et massebalanceled for transport af biocid mellem sedimentet og vandfase (Ligning 4), Freundlich ligningen (Ligning 1) samt et led for omsætningskinetikken af biocid i sedimentet (Ligning 5).

Fjernelse fra vandfasen til sediment via diffusion

$$\frac{dC_e}{dt} = k_{di/BC} \left(C_e - C_{e,sat} \right)^m \frac{A_s}{V_w}$$
(Ligning 3)

Masseændring i sediment (M i kg, V i m3)

$$dC_s M_{TS} = dC_e V_w \tag{Ligning 4}$$

Ligevægt mellem Cs og Ce i sediment

As

$$C_{s,sat} = K_f C_{e,sat}^{1/n}$$
 (Ligning 1)

Omsætning i sedimentet

$$\frac{dC_s}{dt} = k_{BC}C_{e,sat}X_{TS}$$
 (Ligning 5)

Hvor

Overfladeareal af sediment i systemet [m²]

C_{s,sat} koncentration af biocid bundet til sediment ved ligevægt

	mellem biocid i vandfasen og sedimentfasen [µg gTS ⁻¹]
C _{e,sat}	vandfasekoncentration ved ligevægt mellem biocid i
	vandfasen
	og sedimentfasen [μg L ⁻¹]
k _{BC}	Kinetik ratekonstant for omsætning af biocid [s ⁻¹ kgTS ⁻¹ m ³]
<i>k_{difBC}</i>	Kinetik ratekonstant for transport af biocid mellem vand og
	sediment faser [m s⁻¹]
т	En eksponent [-]
MTS	Massen af sediment i systemet [kg]
t	Tid [s]
V_w	Volumen af vandfasen i systemet [m ³]
X _{TS}	Tørstofkoncentration [g TS L ⁻¹]

Der er endvidere antaget en konstant sedimenttykkelse på 10 cm i søen.

Et eksempel på sammenligning mellem den simplificerede og den detaljerede model er vist i Figur 18. Den simplificerede model beskriver de målte data lidt ringere end den detaljerede model. Specielt i den første og sidste del af tidsforløbet afviger den simplificerede model noget fra den detaljerede. For beregning af den gennemsnitlige udledning er disse tidsmæssige yderpunkter er af mindre betydning, da den hydrauliske middelopholdstid i en typisk, veldimensioneret regnvandssø er omkring 2 uger. Omkring denne varighed er der god overensstemmelse mellem den simple og den detaljerede model.



Figur 18 Sammenligning af den simplificerede model og den detaljerede model for terbutryn i regnvandssø B1

3. Resultater og diskussion

3.1 Sorption af biocider til sediment

Koncentrationen af biocider i regnvandssøer kan i princippet reduceres gennem fotooxidation, biologisk nedbrydning, og permanent ophobning i sedimentet. Den førstnævnte proces spiller formentlig kun en underordnet rolle, på grund af biocidernes relativt langsomme fotonedbrydelighed. Således undersøgte Minelgaite et al. (2015) nedbrydningen af diuron, terbutryn og carbendazim i vand fra en regnvandssø og fandt, at de to første biociderne godt nok var nedbrydelige under monokromt UV lys (254 nm), men ikke blev nedbrudt af naturligt sollys over en 2ugers periode. Nyere, veldimensionerede regnvandssøer har typisk en opholdstid svarende hertil, idet de har et volumen, der kan holde 20-30 mm afstrømmet nedbør. Det vil sige, havde søen stået helt uden vand, ville den kunne fyldes af en enkelt regnhændelse på cirka 25 mm. Afhængig af hvor i landet man befinder sig, er den gennemsnitlige årlige afstrømning fra befæstede arealer cirka 400-600 mm. Dette betyder, at regnvandssøerne får en hydrauliske opholdstid omkring 2 uger. Da nedbørsmængderne varierer kraftigt over tid, varierer opholdstiden tilsvarende, men bliver næppe lang nok til, at fotooxidation kan spille en betydende rolle. I søerne er der tilstrækkelig tid til, at der kan forløbe en lang række andre processer, der reducerer stofmængderne i vandet udledt fra søerne (Hvitved-Jacobsen et al., 2010).

Regnvand fra urbane arealer eller motorveje indeholder en del suspenderet stof fra oplandet, hvoraf det meste tilbageholdes i regnvandssøen. Indholdet er typisk 30-300 g TSS m⁻³ med et middelindhold på 90 g TSS m⁻³, hvilket fører til, at der ophobes cirka 1 cm sediment i søen per år. Der er store variationer omkring dette tal, idet nogle oplande bidrager med et højt indhold af sediment, mens andre bidrager med et laverer indhold (Vollertsen et al., 2012).

I forhold til naturlige søer dannes der derfor hele tiden store mængder sediment, som biocider fra regnvandsafstrømningen kan sorberes til. Sorption som permanent fjernelsesmekanisme kan derfor i princippet være af betydning. Endvidere kan biologisk nedbrydning i sedimentet være af betydning, hvilket også tidligere undersøgelser af nedbrydning af pesticider i jord og sediment tyder på (Pesce et al., 2010; Robles-González IV et al., 2008).

I det efterfølgende undersøges sorption og biologisk omsætning af biociderne terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim i sedimenterne fra 6 regnvandssøer (afsnit 2.7). Disse biocider blev valgt som modelstoffer, da de vides at forekomme i materialer til behandling af facader og andre bygningsdele, samt fordi de er rapporteret i væsentlige koncentrationer i regnvand fra byoverflader. Endvidere er cybutryne, terbutryn og diuron på listen over stoffer, der ifølge den europæiske kommission skal moniteres i vandmiljøet (EU, 2013). Terbutryn, cybutryne og diuron er modelstoffer for algicider, mens carbendazim er modelstof for fungicider. Endvidere dækker stofferne et spænd af K_{ow} værdier, hvilket er betydende i forbindelse med den efterfølgende omsætning i sediment og biofilm. Disse resultater relateres i et senere afsnit til naturlige systemer ved hjælp af modelsimuleringer.

3.1.1 Sorptionskapacitet

De målte sorptionskapaciteter er vist i Figur 19. Der blev set tydelig forskel på sedimenternes kapacitet, og for at kunne sammenligne de enkelte sedimenter, blev data simuleret med en Freundlich model (Ligning 1). Simuleringen skete iterativt for at bestemme den værdi af eksponenten *n*, der bedst beskrev det samlede datasæt. De stiplede linjer viser simuleringen af de målte data. Den fundne værdi af *n*, nemlig *n*=1,156, blev derpå anvendt til at bestemme K_f for alle datasæt. Selvom sedimenternes sorptionskapacitet varierede en del, beskrev den valgte fremgangsmåde generelt de målte data godt. Værdierne for K_f set i forhold til sedimentets tørstof er vist Tabel 4, mens Tabel 5 viser de tilsvarende resultater i forhold til prøvernes indhold af organisk stof.



Figur 19 Sorptionsligevægt for sedimenter fra 6 regnvandssøer jf. Figur 3, Tabel 1 og Tabel 2 i forhold til sedimentets tørstofindhold

Der blev observeret en stærk korrelation mellem K_f værdierne for de 4 biocider i de 6 søer, dvs. der var korrelation når kolonnerne i Tabel 4 blev sammenlignet indbyrdes. Spearman Rang Orden Korrelation gav p<0.05 for alle kombinationer af biocider på nær kombinationen terbutryn og carbendazim hvor korrelation var p=0.14. Med andre ord, når sedimentet sorberede meget af ét biocid, sorberede det også meget af de andre, og vise versa.

Som beskrevet i afsnit 2.7.2 blev sorptionsforsøgene ikke bufrede, men foregik ved den pH, der indstillede sig for blandingen af sediment og søvand. Forsøgene varierede i pH fra 5,8 til 7,1. Figur 20 viser en afbildning af pH mod sorptionskoefficienten K_f (Ligning 1) for dels K_f angivet i forhold til sorption til tørstof (TS) i prøven (som vist i Figur 19) og dels K_f angivet i forhold til sedimentets organiske indhold (VS). Samlet tyder denne analyse på, at der kunne være en negativ korrelation mellem pH og sorption af alle 4 biocider.

Tabel 4 Beregnet modelparameter K_f i Freundlich modellen (Ligning 1), set i forhold til prøvernes TS indhold (Figur 19). Eksponenten *n* var i alle tilfælde 1,156

Regnvandssø	Terbutryn	Cybutryne	Diuron	Carbendazim
B1	73,3	64,0	20,2	50,6
B2	73,7	63,4	17,9	17,7
11	402,7	319,0	59,7	208,6
12	42,9	36,6	11,9	13,2
M2	131,8	122,0	25,6	28,5
M3	57,0	49,6	13,8	19,2

Tabel 5 Beregnet modelparameter K_f i Freundlich modellen (Ligning 1), set i forhold til prøvernes VS indhold

Regnvandssø	Terbutryn	Cybutryne	Diuron	Carbendazim
B1	1032	902	285	713
B2	801	689	195	192
11	1644	1302	244	852
12	588	501	163	181
M2	824	762	160	178
M3	687	598	167	231

En tilsvarende afhængighed har tidligere været vist for terbutryn af bl.a. Barriuso et al. (1992), Kah og Brown (2007) og Azejjel et al. (2008). For carbendazim fandt f.eks. Paszko (2012) en stærk afhængighed af jords sorptionskapacitet af pH, hvor de så, at der var en stigende sorption ved faldende pH. For diuron fandt Liu et al. (2010) noget tilsvarende, mens andre for diuron har rapporteret, at de ikke fandt en sådan afhængighed (Sheng et al., 2005).





Sammenhænget mellem octanol/vand fordelingskoefficienten K_{OW} jf. Tabel 3 og beregnede fordelingskoefficienter mellem tørstof og vand (K_{TS}) henholdsvis organisk stof og vand (K_{OC}) er vist i Figur 21. Fordelingskoefficienterne beregnet som den initiale hældning på Freundlich modellen vist i Figur 19. Der blev set et vist sammenhæng mellem K_{OW} og K_{TS} henholdsvis K_{OC} , selvom korrelationen langt fra er overbevisende. Endvidere indikerer den store spredning på de beregnede værdier af K_{TS} og K_{OC} for de enkelte biocider, at sorptionskapaciteten ikke alene kan beskrives ud fra sedimentets tørstofindhold eller dets indhold af organisk stof. Der er en mindre spredning på K_{OC} for de enkelte biocider end der er på K_{TS} , hvilket stemmer overens med, at der ofte ses korrelation mellem indholdet af organisk stof i jord eller sediment og dets evne til at binde disse stoffer (f.eks. Alister et al., 2011). Andre af sedimentets bestanddele, formentlig specielt dets indhold af lermineraler, vil også bidrage til sorptionen (f.eks. Wang og Keller, 2009). Endvidere skal det erindres, at sedimentets pH har stor betydning for sorptionen (Figur 20). Alt i alt viser de fundne resultater for sorption af biocider til søsediment, at der er en ikke uvæsentlig usikkerhed forbundet med at benytte et enkelt tal, f.eks. et stofs rapporterede K_{OW} eller K_{OC} værdi, til at beregne sorption af biocider til søsediment.



Figur 21 Tørstof/vand og organisk stof/vand fordelingskoefficienter i forhold til biocidernes octanol/vand fordelingskoefficienter (jf. Tabel 4 og Tabel 5)

3.1.2 Sorptionskinetik i sedimentsuspensioner

I forbindelse med sorptionsforsøgene blev kinetikken af sorption undersøgt i suspension, bl.a. for at sikre, at sorptionen var forløbet til ende efter de 24 timer, som sorptionsforsøgene varede (Figur 22). Sorptionen blev set at være relativt hurtig i starten, efterfulgt af en mere moderat sorptionsrate over de følgende timer. For at illustrere dette er der i Tabel 6 vist, hvor stor en andel af den samlede sorption skete indenfor de første 15 minutter, den første time og de første tre timer. Graden af sorption er et gennemsnit for alle 6 søer.

Regnvandssø	Terbutryn	Cybutryne	Diuron	Carbendazim
0,25 time	73%	74%	57%	59%
1 time	83%	83%	71%	72%
3 timer	91%	92%	86%	84%
24 timer	100%	100%	100%	100%

Tabel 6 Relativ andel af den samlede sorption over tid. Gennemsnit for alle 6 søer



Figur 22 Sorptionskinetik målt over 1 døgn

3.2 Fjernelse og nedbrydning af biocider i sediment mikrokosmer

3.2.1 Målt fjernelse og nedbrydning af biocider

Nedbrydning af biocider blev undersøgt i mikrokosmer med sediment, hvor biocider blev tilsat vandfasen (afsnit 0). Vandfasekoncentrationen blev fulgt over 3 uger, hvorefter sedimentets indhold af biocider blev analyseret så massebalancen kunne lukkes. Figur 23 viser forløbet af biocid i vandfasen normaliseret i forhold til sedimentets tørstofindhold. Det ses tydeligt, at sedimentet fortsatte med at have kapacitet til at optage og nedbryde biocider ud over de tre uger, forsøget varede.



Figur 23 Fjernelse af biocider fra vandfasen i sediment mikrokosmer. Start vandfasekoncentrationer fremgår af Tabel 7

	тв	IRG	DR	CD
	[µg L ⁻¹]	[µg L ⁻¹]	[µg L ⁻¹]	[µg L-1]
B1	100,4	49,6	83,9	108,0
B2	102,3	52,0	86,9	110,9
11	100,4	49,7	84,5	108,8
12	108,5	55,4	91,5	112,1
M2	107,2	56,2	89,3	115,6
M3	102,3	49,1	83,4	106,0
Genfinding ved ekstraktion [%]	101	108	109	104
Standardafvigelse [%]	7	9	8	14

Tabel 7 Startkoncentrationer i forsøg med fjernelse og nedbrydning af biocid i sediment mikrokosmer

En af årsagerne til at biocider blev fjernet fra vandfasen må være, at biociderne diffunderede ind i sedimentfasen, hvor de sorberede til partiklerne. En anden årsag kunne være, at biociderne blev omsat i sedimentet efterhånden som de trængte ind heri. Det er nærliggende at antage, at den observerede fjernelse af biocid fra vandfasen i praksis skyldes en kombination af disse to fænomener. Diffusion ind i sedimentet med efterfølgende sorption og muligvis en vis omsætning, stemmer umiddelbart overens med observationerne i Figur 23, hvor der blev set en relativt hurtig fjernelsesrate i begyndelsen af forsøget, der så aftager i over tid. Det forekommer rimeligt at antage, at biociderne i starten af forsøget sorberede til de øverste sedimentlag, men efterhånden som tiden gik, blev kapaciteten opbrugt, og biociderne skulle diffundere dybere ind i sedimentet for at sorberes. Denne 'forsinkelse' af sorptionen på grund af diffusion ind i sedimentet blev i vandfasen set som en aftagende fjernelsesrate.

For at teste om datasættet vist i Figur 23 kan forklares alene ved diffusion efterfulgt af sorption til sedimentet, blev vandfasekoncentrationen ved eksperimentets slut sammenlignet med hvad den skulle have været, hvis hele sedimentets beregnede sorptionskapacitet havde været opbrugt (Tabel 8). Sidstnævnte blev beregnet ud fra Ligning 1 og konstanterne i Tabel 4, samt en antagelse om, at biociderne var inerte og ikke blev nedbrudt.

Sammenligningen viser en markant forskel på de beregnede og målte værdier, hvor de målte værdier for terbutryn, cybutryne, diuron og carbendazim i snit er henholdsvis 4,0, 3,5, 1,5 og 1,8 gange højere end hvad der beregningsmæssigt skulle have været, hvis al sedimentets sorptionskapacitet havde været udnyttet. Efter de 3 uger forsøget varede, var der derfor fortsat rigeligt med sorptionskapacitet i sedimentet, og diffusion med efterfølgende sorption kunne dermed i princippet forklare datasættet. Analysen kan ikke bruges til at udelukke, at der samtidigt sker en nedbrydning af biociderne.

Regnvandssø	Vandfase koncentration	Terbutryn [µg L ⁻¹]	Cybutryne [µg L ⁻¹]	Diuron [µg L ⁻¹]	Carbendazim [µg L ⁻¹]
B1	Beregnet	5,2	2,7	15,8	8,5
	Målt	58,9	27,7	51,5	60,4
B2	Beregnet	13,2	7,1	35,7	47
	Målt	44,7	20,5	46,8	57,5
11	Beregnet	3,7	2,1	20,7	8,3
	Målt	32,3	15,2	38,1	47,6
12	Beregnet	21	11,4	44,7	52,4
	Målt	45,7	21,2	48,5	59,4
M2	Beregnet	8,3	4,3	30,3	37,2
	Målt	39,7	18,3	41,9	54,8
M3	Beregnet	14,4	7,2	36,2	37,9
	Målt	44,8	21,2	47,3	58

Tabel 8 Målt vandfasekoncentration samt koncentrationen, der beregningsmæssigt ville have været i vandfasen, hvis sedimentet havde været suspenderet heri

For at kvantificere andelen af biocid der blev fjernet fra sedimentfasen ved nedbrydning, blev disse ekstraheret fra sedimentet (afsnit 2.3.1). Den ekstraherede biocidmasse indgik i en massebalance sammen med massen i vandfase ved forsøgets slut og biocidmasserne i de vandprøver, der blev udtaget under selve nedbrydningsforsøget. Idet både vandfasemålingerne og sedimentekstraktionerne er gennemført rigoristisk og kontrolleret for genfinding, svarer den manglende masse til omsætningen af biociderne i mikrokosmerne. Resultatet af massebalancen er vist i Figur 24, hvor det ses, at alle biociderne undergik en vis omsætning med omsætningen af carbendazim > terbutryn > cybutryne (irgarol 1051) > diuron. I snit blev der omsat henholdsvis 29%, 28%, 19% og 17% af den tilsatte biocidmasse.

Betragtes alene fjernelsen i vandfasen (Figur 23) og forsøges dette forløb simuleret med en simpel 1. ordens nedbrydningsfunktion ($dC/dt = -kC^1$), fås ringe overensstemmelse med målingerne. Dette svarer til forventningerne, idet der intet fysisk grundlag er for, at koncentrationerne i vandfasen skulle følge et sådant forløb. Fjernelsen skulle derimod være styret af et komplekst samspil mellem diffusion ind i sedimentet, sorption hertil, samt nedbrydning heri (afsnit 2.7.7). Simuleres forløbet af vandfasekoncentrationer (Figur 23) som ren blackbox med en n'te ordens funktion ($dC/dt = -kC^n$) fås, at processens snarere beskrives af en procesrate er i omegnen af 4. orden. I det efterfølgende afsnit (afsnit 3.2.2) simuleres nedbrydning derfor med en mere kompleks men fysisk mere rigtig model.





For sammenligning med den lange række studier, der har beskrevet nedbrydning af forskellige kemiske stoffer ved en simpel 1. ordens proces, er der i Tabel 9 vist 1. ordens ratekonstanter og halveringstider for såvel den samlede fjernelse fra vandfasen som for nedbrydningen i sedimentet alene. Bemærk at en simpel 1. ordens proces kan være en rimelig tilgang, hvis der ses på sedimenter i suspension, men sjældent er det i mere komplekse systemer, som det der er undersøgt i nærværende studie. Beregningerne for den samlede fjernelse fra vandfasen er udført ved at sammenholde massen af biocid i vandfasen ved start og slut af forsøget, mens beregningerne for nedbrydning alene er udført ved at sammenholde massen af biocid i hele mikrokosmet ved forsøgets start og slut.

Tabel 9 Førsteordens ratekonstanter og halveringstider for såvel den samlede fjernelse
fra vandfasen ($k1_{fjern}$ hhv. $t^{1/2}_{fjern}$) som for nedbrydningen i sedimentet alene ($k1_{nedbr}$ hhv.
t ¹ / _{2 nedbr})

Sø		ТВ	IRG	DR	CD
B1	k1 _{fjern}	0,0280	0,0305	0,0262	0,0316
	t½ _{fjern}	24,8	22,7	26,5	21,9
	k1 _{nedbr}	0,0154	0,0103	0,0126	0,0199
	t1/2nedbr	44,9	67,2	55,1	34,9
B2	k1 _{fjern}	0,0400	0,0453	0,0305	0,0334
	t½ _{fjern}	17,3	15,3	22,7	20,8
	k1 _{nedbr}	0,0148	0,0105	0,0090	0,0163
	t ¹ / _{2nedbr}	46,7	66,1	76,7	42,5
11	k1 _{fjern}	0,0558	0,0577	0,0373	0,0431
	t½ _{fjern}	12,4	12,0	18,6	16,1
	k1 _{nedbr}	0,0167	0,0101	0,0078	0,0158
	t ¹ / _{2nedbr}	41,5	68,4	89,3	43,8
12	k1 _{fjern}	0,0425	0,0455	0,0307	0,0313
	t½ _{fjern}	16,3	15,2	22,5	22,2
	k1 _{nedbr}	0,0120	0,0063	0,0042	0,0114
	t ¹ / _{2nedbr}	57,8	109,2	163,4	60,7
M2	k1 _{fjern}	0,0425	0,0455	0,0307	0,0313
	t½ _{fjern}	16,3	15,2	22,5	22,2
	k1 _{nedbr}	0,0162	0,0137	0,0097	0,0175
	t ¹ / _{2nedbr}	42,8	50,7	71,2	39,6
М3	k1 _{fjern}	0,0482	0,0565	0,0350	0,0363
	t½ _{fjern}	14,4	12,3	19,8	19,1
	k1 _{nedbr}	0,0175	0,0086	0,0086	0,0183
	t½ _{nedbr}	39,6	80,3	80,5	38,0

3.2.2 Simulering af biocidnedbrydning i sediment mikrokosmer

Nedbrydningsmodellen er opbygget som en 1-dimensionel boksmodel som beskrevet i afsnit 2.7.7. Modellen antager, at vandfasen over sedimentlaget er fuldt opblandet, at der findes et diffusivt grænselag mellem den fuldt opblandede vandfase og sedimentet, samt at transporten gennem grænselaget og sedimentet kan beskrives ved simpel diffusion.

En del af modellens konstanter er fastlagt ud fra målinger på sedimentet og vandfasen i mikrokosmerne, mens andre er kalibreringskonstanter. I den førstnævnte kategori er sedimentets indhold af tørstof og organisk stof, begyndelseskoncentrationerne i vandfasen, og adsorptionskoefficiententerne K_f og n i Freundlich isotermerne (Ligning 1) som bestemt i afsnit 0. Hertil kommer temperaturen på 10°C, som alle forsøg er kørt ved, sammen med en Arrhenius temperaturkoefficient på 1.07. Tørstof, organisk stof, og start biocidkoncentrationer er samlet præsenteret i Tabel 10.

Sorptionskinetikken er simuleret som en første ordens rateproces i forskellen mellem sedimentets sorptionskapacitet og den allerede sorberede biocidkoncentration. Som global konstant for sorptionskinetikken er brugt 10⁻³ s⁻¹, hvilket stemmer rimeligt overens med målingerne af sorptionskinetik i sedimentsuspensioner (afsnit 3.1.2). Det skal her bemærkes, at der må forventes forskelle i sorptionsrater for sediment i suspension og for fast aflejret sediment.

Som kalibreringskonstanter er benyttet dels diffusionskoefficienterne for de 4 biocider (D_{BC}) og dels nedbrydningsratekonstanterne (k_{BC}). Diffusionskoefficienterne i rent vand og sediment er forskellige, og endvidere er diffusionskoefficienterne for de 4 biocider ikke velbestemt i litteraturen, hvilket tilsammen er begrundelsen for, at diffusionskoefficienterne er kalibreringskonstanter i modellen. Nedbrydningsraten vil være afhængig af en lang række forhold i sedimentet, herunder tilgængelighed af elektronacceptorer og -donorer. Disse forhold er ikke kvantificeret, og ændrer sig i øvrigt over tid. Der er derfor alene opereret med en gennemsnitlig nedbrydningsratekonstant i simuleringen af nedbrydningen.

Tabel 10 Indhold af tørstof (X _{TS}) or organisk stof målt som glødetab (X _{VS}) i sedimentet fi	ra
de 6 regnvandssøer	

Regnvandssø	<i>X</i> _{7S} [g L ⁻¹]	<i>X</i> vs [g L⁻¹]	С _{0,7В} [µg L ⁻¹]	С _{о,IRG} [µg L ⁻¹]	С _{0,DR} [µg L ⁻¹]	С _{0,СD} [µg L ⁻¹]
B1	376,0	26,7	100,4	49,6	87	108
B2	167,4	16,3	102,3	52	86,9	111,9
11	102,4	24,5	100,4	49,7	84,5	108,8
12	188,7	20,2	108,5	55,4	91,5	112,1
M2	156,8	24,9	107,2	56,2	89,3	115,6
M3	196,5	14,6	102,3	49,1	83,4	106

Figur 25, Figur 26 og Figur 27 viser overensstemmelsen mellem de målte biocidkoncentrationer i de 6 sediment mikrokosmer og simuleringerne. Tabel 11 viser kalibreringskonstanterne fundet ved simuleringerne. Diffusionskoefficienterne var mellem 0,05 og 1,5 10⁻⁹ m² s⁻¹, hvilket er indenfor rammerne af typiske diffusionskoefficienter for denne størrelse molekyler i rent vand. Simuleringerne tyder derfor på, at diffusionsraterne ikke er væsentligt hæmmet i sedimentet i forhold til vandfasen. Generelt fulgtes diffusionskoefficienterne for de 4 biocider ad med hensyn til de 6 søer. Den laveste gennemsnitlige diffusionskoefficient fandtes for sediment fra regnvandssø B1, mens den højeste fandtes for regnvandssø I2.



Figur 25 Simulering af biocidnedbrydning i mikrokosmer med vandfase og sediment. Regnvandssø B1 og B2



Figur 26 Simulering af biocidnedbrydning i mikrokosmer med vandfase og sediment. Regnvandssø I1 og I2



Figur 27 Simulering af biocidnedbrydning i mikrokosmer med vandfase og sediment. Regnvandssø M2 og M3

Tabel 11 Kalibrerede diffusionskoefficienter for sediment nedbrydningsforsøg

Regnvandssø	<i>D_{тв}</i> [10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	<i>D_{IRG}</i> [10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	<i>D_{DR}</i> [10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	<i>D_{CD}</i> [10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	Middelværdi [10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]
B1	0,05	0,10	0,20	0,09	0,11
B2	0,40	0,70	0,80	0,80	0,68
11	0,30	0,47	0,80	0,28	0,46
12	0,80	1,20	1,50	0,90	1,10
M2	0,40	0,70	0,90	0,70	0,68
M3	0,35	0,50	0,60	0,40	0,46
Middelværdi	0,38	0,61	0,80	0,53	

Tabel 12 viser de kalibrerede nedbrydningskonstanter. Ligesom for diffusionskoefficienterne fulgtes også nedbrydningsratekonstanterne ad med hensyn til hvilken regnvandssø sedimentet stammede fra. Således havde I1 og B1 de højeste nedbrydningsratekonstanter, mens regnvandssø I2 havde de laveste. Af de 4 biocider var terbutryn den mest nedbrydelige, fulgt af carbendaxim, cybutryne og diuron.

Tabel 12 Kalibrerede nedbrydningsratekonstanter for sediment nedbrydningsforsøg (Ligning 2)

Regnvandssø	<i>к_{тв}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	<i>k_{IRG}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	<i>k_{DR}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	<i>k_{CD}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	Middelværdi [10 ⁻⁷ s ⁻¹]
B1	26,89	5,12	4,93	23,76	15,17
B2	12,35	3,08	2,77	6,23	6,11
11	44,06	9,22	4,29	34,56	23,03
12	5,14	1,14	1,28	3,82	2,84
M2	18,68	5,99	3,26	8,97	9,22
M3	13,37	2,39	2,35	9,56	6,92
Middelværdi	20,08	4,49	3,15	14,48	

Relateres nedbrydningsratekonstanterne til det organiske indhold i sedimentet i stedet for til tørstofindholdet, altså at X_{TS} i Ligning 2 erstattes med X_{VS} , fås de i Tabel 13 viste konstanter. Den relative nedbrydelighed af de 4 biocider er uændret når nedbrydningen relateres til det organiske stof i stedet for det totale indhold af tørstof. Den relative rangorden af nedbrydnings-ratekonstanterne ændrer sig lidt, idet regnvandssø B1 og I1 bytter plads i rangordningen, idet B1 her har den højeste ratekonstant. De andre ratekonstanters rangorden er uændret, med I2 som havende den laveste ratekonstant.

Tabel 13 Kalibrerede nedbrydningsratekonstanter for sediment nedbrydningsforsøg (Ligning 2) – konstanterne relateret til organisk stof

Regnvandssø	<i>k_{тв}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	<i>k_{IRG}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	<i>k_{DR}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	<i>k_{CD}</i> [10 ⁻⁷ s ⁻¹]	Middelværdi [10 ⁻⁷ s ⁻¹]
B1	378.7	72.1	69.4	334.6	213.7
B2	126.8	31.6	28.4	63.9	62.7
11	184.2	38.5	17.9	144.4	96.3
12	48.0	10.6	11.9	35.7	26.6
M2	117.6	37.7	20.5	56.5	58.1
M3	179.9	32.2	31.7	128.6	93.1
Middelværdi	172.6	37.1	30.0	127.3	

3.2.3 Nedbrydning af biocider i mesokosmer i en regnvandssø

Forsøget var designet til at undersøge fytoplanktonsamfund i mesokosmer i en regnvandssø, men fortæller også en del om sorption og desorption af biocider under naturlige forhold. Forsøget var opbygget i regnvandssø B1 som 10 kosmer på 500 mm diameter (afsnit 2.6.3). Der blev tilstræbt koncentrationer på 100 ng L⁻¹ henholdsvis 1000 ng L⁻¹ af terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim til hver sit kosmos (altså 8 kosmer med biocider), samt 2 blanke kosmer uden tilsætning af biocider. Biocid blev derpå målt i kosmerne ved forsøgets start, tid 0, 3, 6, 9, 12 og 15 døgn. Biocid blev endvidere målt to steder i selve søen under hele forsøget (lige udenfor de to sæt mesokosmer på hver sin bred (Figur 9 nederst til højre)).

Målinger af biocider i de to steder i selve søen (Figur 28) viste en nogenlunde konstant baggrund af terbutryn og carbendazim med en middelkoncentration på 31 ng L⁻¹ henholdsvis 24 ng L⁻¹. I en enkelt af prøverne blev der endvidere fundet en smule cybutryne. Stigningen i biocidkoncentration mellem dag 6 (13. august) og 9 (16. august) skyldes formentlig nedbørshændelsen på 14,4 mm den 15. august (Figur 10).





I de to mesokosmer hvor der ikke blev tilsat biocid, blev der ligeledes fundet en baggrund af terbutryn og carbendazim (Figur 29). For terbutryn var baggrunden i middel 32 ng L⁻¹ og dermed på samme niveau som i søen udenfor kosmerne. Carbendazim derimod lå en del højere end i søen. I kosmet "Blank 1" lå den i middel på 477 ng L⁻¹, stigende fra godt 200 ng L⁻¹ på dag 0 til knap 800 ng L⁻¹ på dag 12 (dag 6 og 15 blev ikke målt, da prøverne bortkom). I kosmet "Blank 2" steg koncentrationen under forsøget fra knap 50 ng L⁻¹ på dag 0 til godt 150 ng L⁻¹ på dag 15, med en middelkoncentration på 94 ng L⁻¹. Et lignende fænomen blev set for de resterende 8 kosmer (Figur 30 til Figur 33).

For at teste hvorvidt fundene af carbendazim kunne skyldes en intern kontaminering, altså hvorvidt det anvendte materiale til opbygning af mesokosmerne (polycarbonate) kunne have frigivet carbendazim, blev stykker af det anvendte polycarbonate placeret i dels demivand og dels vand fra regnvandssø B1, og koncentrationen i vandet fulgt over 2 uger. Dette førte ikke

til målbar frigivelse af carbendazim fra materialet. For endvidere at sikre, at selve analysen var korrekt udført, blev udvalgte prøver analyseret på et andet laboratorie. Biocidmåling i mesokosmosforsøgene blev alle udført på Aalborg Universitet med HPLC-MS som beskrevet i afsnit 2.3.1. Udvalgte prøver blev derpå analyseret på Aarhus Universitet med HPLC-MS/MS som beskrevet i afsnit 2.3.1. Begge analyser gav samme resultat, og analysefejl blev dermed også udelukket som forklaring.





En mulig forklaring på de stigende carbendazim koncentrationer er, at der kort før forsøgets start kan have været en markant tilledning af carbendazim til søen, som derpå blev sorberet i sedimentet. Denne tilledning kan være kommet i den våde periode i slutningen af juli, hvor der samlet faldt 43,8 mm, eller den 4. august hvor der faldt 9,8 mm (Figur 10). Herpå kan der være sket en løbende udskiftning af vandfasen på grund af infiltration til ledningsnettet, der kan have fortyndet vandfasen (efter større vådperioder løber der typisk 2-5 L s⁻¹ til søen under tørvejr). Herpå kan carbendazimet have desorberet fra sedimentet til vandfasen. Grunden til at koncentrationen ikke steg på samme vis i selve søen kan have været, at der løbende har været vand-udskiftning i søen under forsøgsperioden (tørvejrsvandføring på grund af infiltration til ledningsnettet), hvilket har fortyndet og fjernet det desorberede carbendazim. En af årsagerne til de observerede forskelle i de målte baggrundskoncentrationer i mesokosmerne kunne have været, at kosmerne var placeret i hver sin side af søen (f.eks. var Blank 1 og 2 placeret i hver sin side) og dermed muligvis har været udsat for forskellig biocidkoncentration under afstrømningshændelser. En anden årsag kunne være relateret til forskelle i sedimentets evne til at sorbere carbendazim.

En anden mulig forklaring kunne være ulovlig anvendelse af fungicidet benomyl. Dette stof har længe været forbudt i såvel EU som USA, men har tidligere fundet anvendelse til mange formål, herunder bekæmpelse på grøntsager (US EPA, 2001). Benomyl nedbrydes relativt hurtigt til carbendizim, og det kunne derfor være carbendazim som nedbrydningsprodukt af benomyl, der ses i forsøget. En tredje forklaring, og nok den mest sandsynlige, er, at der har været tale om brug af det godkendte pesticid thiophanate-methyl, der er et fungicid til friland og som også bruges i væksthuse. Thiophanate-methyl har carbendazim som nedbrydningsprodukt. Det forekommer sandsynligt, at det er dette stof, der har været brugt i haver i oplandet til regnvandssø B1, og derpå er blevet ført med det afstrømmende regnvand til søen, for så her at blive nedbrudt til carbendazim.

I de to kosmer hvor der blev tilstræbt en koncentration på henholdsvis 100 og 1000 ng L⁻¹ (Figur 30) ses, at der sker et tydeligt og jævnt fald i koncentrationer under forsøget. Faldet må tilskrives optag i sedimentet, og stemmer i øvrigt rimeligt overens med laboratoriestudierne af sedimentets optag af biocider (afsnit 3.2.1). Som diskuteret tidligere i dette afsnit, blev der også set en tydelig frigivelse af carbendazim i kosmet "IRG 1000", og en tydelig baggrund heraf i kosmet "IRG 100". Begge kosmer viser endvidere en tydelig baggrund af terbutryn.

Figur 31 viser de tilsvarende resultater for terbutryn. Begge kosmer viser et fald i koncentration over tid, til et niveau svarende til cirka den baggrund, der blev fundet i de andre kosmer. Koncentrationerne til dag 0 var noget højere end forventet, hvilket formentlig skyldes den tidligere påviste baggrundskoncentration af terbutryn. Også i disse forsøg steg indholdet carbendazim jævnt under forsøget, sandsynligvis på grund af frigivelse fra sedimentet.

Resultaterne for de to kosmer med diuron er vist i Figur 32. Tilsætningen af diuron til en koncentration af 100 ng L⁻¹ kunne ikke detekteres, hvilket skyldtes problemer med detektionsgrænsen for diuron i den kørte måleserie. For tilsætningen til 1000 ng L⁻¹ var målingen dag 0 ganske lav, men målingen dag 3 og de efterfølgende dage stemmer overens med hvad der kan forventes, altså at det tilsatte diuron over tid blev sorberet til sedimentet.



Figur 30 Biocidkoncentrationer målt i kosmerne hvor der blev tilsat cybutryne (irgarol 1051) IRG. Til venstre er den tilstræbte tilsætning af 100 ng L⁻¹, til højre den tilstræbte tilsætning af 1000 ng L⁻¹. Bemærk forskellig skala på ordinatakserne.



Figur 31 Biocidkoncentrationer målt i kosmerne hvor der blev tilsat terbutryn (TB). Til venstre er den tilstræbte tilsætning af 100 ng L⁻¹, til højre den tilstræbte tilsætning af 1000 ng L⁻¹. Bemærk forskellig skala på ordinatakserne.



Figur 32 Biocidkoncentrationer målt i kosmerne hvor der blev tilsat diuron (DR). Til venstre er den tilstræbte tilsætning af 100 ng L⁻¹, til højre den tilstræbte tilsætning af 1000 ng L⁻¹. Bemærk forskellig skala på ordinatakserne.



Figur 33 Biocidkoncentrationer målt i kosmerne hvor der blev tilsat carbendazim (CD). Til venstre er den tilstræbte tilsætning af 100 ng L⁻¹, til højre den tilstræbte tilsætning af 1000 ng L⁻¹. Analyserne af terbutryn (TB) dag 3 og 15 mislykkedes. Bemærk forskellig skala på ordinatakserne.

For carbendazim er resultaterne vist i Figur 33. For den tilstræbte startkoncentration på 100 ng L⁻¹ falder resultaterne i tråd med observationerne fra de andre kolonner, altså at carbendazim steg jævnt under forsøget. For 1000 ng L⁻¹ var resultaterne lidt mere uklare, idet målingen de første dage lå noget under den planlagte startkoncentration. Koncentrationen steg over tid ligesom i de andre kolonner.

3.2.4 Udvikling i biocidkoncentrationer i en regnvandssø over tid

I perioden fra den 11. november 2015 til den 10. januar 2016 blev der udtaget tidsproportionale vandprøver fra regnvandssø B1 jævnfør afsnit 2.7.6. Perioden repræsenterer en tid på året hvor forventes, at der ikke påføres biocidholdige materialer på bygningsfacader. Denne periode skulle derfor reflektere den kontinuerte udvaskning af biocider fra bygningsmassen uden de pludselig spidsudledninger, der for eksempel kan komme, når det har regnet lige efter en facade er blevet behandlet, eller hvis materialerester (så som maling) fejlagtigt bliver ledt til regnvandssystemet. Der blev målt 13 biocider med HPLC-MS/MS jf. afsnit 2.3.1. Resultatet af målingerne er vist i Figur 34 og Figur 35 og man ser, at det meste af tiden lå koncentrationerne af de fleste biocider omkring eller under 20 ng L⁻¹. Temperaturerne var positive frem til cirka den 2. januar, hvorefter der var moderat frost frem til prøveperiodens slut.

For en del af biociderne (methylisothiazolinone, isoproturon, iodocarb, terbutryn, octylisothiazolinone, tebuconazole, propiconazole, carbendazim) var der en markant stigning i biocidkoncentrationer lige omkring juleaften. Biocider kommer med afstrømningen af regnvand fra oplandet, og i Figur 36 ses forløbet af nedbør og afstrømningen til regnvandssøen op til og under måleperioden. Blandeprøven, der dækkede de observerede peaks omkring juleaften, startede den 21. december og sluttede den 25. december. I denne periode faldt der 33,4 mm nedbør på oplandet. Forud herfor havde der været en tørvejrsperiode fra den 14. til den 21. december. Der er dermed noget der tyder på, at der har været en anvendelse af biocidholdige produkter i perioden lige op til jul, der derpå blev udvasket under de relativt våde juledage. Hvilken form en sådan anvendelse har haft henstår i det uvisse.



Figur 34 Biocid feltmålinger november 2015 til januar 2016, methylisothiazolinone (MI); carbendazim (CD); mecoprop (MCPP), isoproturon (IP), iodocarb (IPBC), diuron (DR), terbutryn (TB), cybutryne (irgarol 1051) (IRG)



Figur 35 Biocid feltmålinger november 2015 til januar 2016, octylisothiazolinone (OIT), tebuconazole (TBU), dichloroisothiazolinone (DCOIT), propiconazole (PPZ



Figur 36 Nedbør og afstrømning til regnvandssø B1 i perioden 1. oktober 2015 til 10. januar 2016

3.2.5 Simulering med lange historiske regnserier

Den simple model beskrevet i afsnit 2.9.1 blev kalibreret til datasættet for målt nedbrydning af biocider (afsnit 3.2.1). Et eksempel herpå er vist i Figur 37 hvor det ses, at den opstillede simple model er i stand til at reproducere målingerne i tilfredsstillende grad. På grund af modellens simpelhed og det forhold, at der ikke var store forskelle i dels biocidernes nedbrydningsrater og dels deres diffusionsrater i sedimentet, er det valgt alene at simulere med ét sæt konstanter. Med andre ord, der er simuleret for et gennemsnitligt biocid, der svarer til gennemsnit

tet af de 4 undersøgte. Konstanterne i den simple model var m = 4; $k_{difBC} = 1.8 \ 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$; $k_{BC} = 1 \ 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ kgTS}^{-1} \text{ m}^{3}$.

Figur 38 viser en simulering af vandfasekoncentrationen af modelbiocidet ved en konstant tilløbskoncentration af på 50 ng L⁻¹. Simuleringerne er lavet for regnvandssø B1 og for tiden 1. januar til 31. december 2015. Figur 39 viser den tilsvarende mængde modelbiocid bundet i sedimentet i denne periode. Da de initiale værdier har været nul i såvel søens vandfase som sedimentfase, har modellen været kørt et halvt år op til den 1. januar for at sikre, at den er indkørt til datasættet. Det ses at regnvandssøen giver en beskeden reduktion af udledningen fra de 50 ng L⁻¹ der var i tilløbet, til i snit 48 ng L⁻¹ i udløbet (middel af perioden).



Figur 37 Eksempel på kalibrering af simpel sorptions/omsætningsmodel til målt fjernelse af biocid i vandfasen i sediment mikrokosmosforsøg (afsnit 3.2.1). De målte data er fra regnvandssø B1



Figur 38 Simuleret vandfasekoncentration af modelbiocid for regnvandssø B1. Konstant tilløbskoncentration på 50 ng L⁻¹



Figur 39 Simuleret sedimentkoncentration af modelbiocid for regnvandssø B1. Konstant tilløbskoncentration på 50 ng L⁻¹

I praksis er indholdet af biocid i regnvandet ikke konstant, men varierer fra hændelse til hændelse. I sjældne tilfælde kan biocidindholdet i tilledningen således være 1 til 2 dekader højere end middelkoncentrationen (Bester et al., 2014). Figur 40 viser et eksempel på en sådan simulering hvor regnhændelsen den 22. juni 2015 blev tildelt en 20 gange højere koncentration end middelindholdet i tilledningen, altså 1000 ng L⁻¹. Regnhændelsen varede 6 timer og bidrog med knap 1500 m³ afstrømning, svarende til cirka 70% af søens volumen. Det ses, at denne koncentration bliver væsentligt udlignet i søen, men at søens indhold forbliver forhøjet en måneds tid efter hændelsen. Ses på tilsvarende vis på sedimentets indhold af biocid fås en tilsvarende spids (Figur 41). Grunden til at indholdet i sedimentet falder kraftigt i forhold til, hvad der kan forklares ved omsætning i sedimentet er, at sedimentet igen desorberer en stor del af det bundne biocid til vandfasen.



Figur 40 Simuleret modelbiocid i vandfasen ved pulsbelastning med 20 gange højere biocidkoncentration til en stor regnhændelse den 22. juni 2015.



Figur 41 Simuleret modelbiocid i sedimentet ved pulsbelastning med 20 gange højere biocidkoncentration til en stor regnhændelse den 22. juni 2015.

Biocidindholdet i det afstrømmende regnvand varierer alt efter hvilke aktiviteter, der har fundet sted i oplandet, nedbørsintensitet og vindretning (Bester et al., 2014). For at simulere denne variation benyttes en stokastisk model for biocidkoncentrationen sammen med den simplificerede omsætningsmodel (afsnit 2.9.1). Biocidkoncentrationen i tilløbsvandet blev generet ud fra de af Bester et al. (2014) målte fordelinger af biocidkoncentrationer, der kunne beskrives ved log-normalfordelinger. For hver regnhændelse blev der fra de fundne fordelinger trukket en ny biocidkoncentration til simulering af indløbskoncentrationerne. Med andre ord så varierer ind-holdet i regnvandet, der løber ind i søen, efter samme statistiske mønster, som hvad der blev fundet af Bester et al. (2014). Herved fås et realistisk mønster på den biocidvariation, der kan forventes i en regnvandssø.



Figur 42 Simuleret modelbiocid i vandfasen ved stokastisk simulering af indløbskoncentrationen

Man ser, at søen udligner belastningen gennem dels opblanding i vandfasen og dels gennem tilbageholdelse i sedimentet, men efterfølgende desorption når koncentrationerne i vandfasen igen falder (Figur 42 og Figur 43). Simuleringerne er gennemført så middelkoncentrationen af biocid i tilløbet var 50 ng L⁻¹.



Figur 43 Simuleret modelbiocid i sedimentet ved stokastisk simulering af indløbskoncentrationen

3.3 Sorption og omsætning til filterjord

3.3.1 Hydraulisk karakterisering af jordfiltre

Hydrauliske karakteristika for jordfiltrene blev undersøgt forud for sorptions- og fjernelsesforsøgene. Porevolumen og porøsitet blev undersøgt for materialerne rent sand, sand + 0,5% spagnum samt sand + 1% spagnum ved brug af en tracer (natrium bromid). Porevolumenet (V_{void}) for hver søjle blev bestemt individuelt ud fra vandføringen (*F*) og tracerens opholdstid i søjlen (*t*_r) (ligning 6) og fastsat som toppunkt af gennembrud.

$$V_{void} = t_r F \tag{Ligning 6}$$

Derpå blev porøsiteten ϕ bestemt ud fra filtermaterialets bulk volumen (V_{bulk}) og porevolumenet (ligning 7).

 $\phi = \frac{V_{void}}{V_{bulk}}$ (Ligning 7)

Jordfiltersøjlen med 0,5% spagnum havde et højere porevolumen (81,7 mL) i forhold til de to andre kolonner (0% spagnum: 75,5 mL; 1% spagnum: 77,5 mL). En medvirkende årsag til det højre porevolumen i søjlen med 0,5% spagnum var, at materialet i søjlen fyldte lidt mere end i de to andre. Porøsiteten af de 3 kolonner blev nogenlunde ens, nemlig henholdsvis 0,47, 0,49 og 0,48.

3.3.2 Sorption til filterjord

Søjleforsøg blev udført for at undersøge effekten af spagnum som organisk stof i sorptionen af 9 repræsentative biocider (afsnit 2.8). Spagnum blev valgt som organisk stof i filterjorden, idet dette materiale ofte vælges i forbindelse med etablering af filterjorde til rensning af afstrømmmet regnvand. Idet søjlerne blev fødet med renset spildevand i flere måneder forud for forsøgene, havde der udviklet sig en biofilm på partiklernes overflader i søjlerne. Sorption af biocider vil derfor have fundet sted dels til denne biofilm og dels til spagnummet. Sandet forventes at have ingen, eller kun beskeden, kapacitet til at sorbere biociderne.

Volumenet af opløsningsmiddel (vand) brugt til at eluere biocider fra søjlerne blev beregnet med samme ligning som brugt til at beregne porevolumenet (ligning 6). Det eluerede volumen antages at være direkte korreleret til sorptionen af biocider til filtermaterialet. Værdien for hvert kromatogram blev normaliseret med maksima af toppene fra UV detektorens respons, for herved at få et bedre overblik over kromatogrammerne. Resultaterne af disse forsøg er vist i Figur 44. Mens nogle af biociderne eluerede med den samme mængde vand som traceren (methylisothiazolinone, benzisothiazolinone, mecoprop), eluerede andre biocider langsommere, og der skulle bruges flere porevolumener før biociderne blev eluerede. For sidstnævnte sås en klar tendens til, at det nødvendige elueringsvolumen steg med stigende indhold af organisk stof i søjlen. Endvidere blev peakene af kromatogrammerne bredere med stigende elueringsvolumen.



Figur 44 Elueringsvolumen af biocider med en flowrate af 0,25 mL min⁻¹ på jordfiltersøjler med 0%, 0,5% og 1% spagnum. Stiplede linjer viser tracerens elueringsvolumen

For at kunne sammenligne resultaterne fra de tre søjler blev det effektive elueringsvolumen (V_{eff}) beregnet som forskellen mellem et stofs elueringsvolumen (V_{eff}) og kolonnens porevolumen (V_{void}) (ligning 8).

 $V_{eff} = V_{ret} - V_{void}$ (Ligning 8)

Overordnet set sorberede 5 af biociderne til filtermaterialet, mens de resterende 4 ikke udviste nogen sorption, eller kun beskeden sorption. Som det ses af Figur 45, steg det effektive elueringsvolumen, altså sorptionen af biocidet i søjlen, med sandets indhold af organisk stof. I de fleste tilfælde sås en klar lineær korrelation mellem de to parametre, hvilket indikerede at organisk stof så som spagnum har en stor betydning for sorptionen af biocid til filtermaterialet. I tilfælde af søjlen med rent kvartssand blev der ved etablering af søjlen ikke tilsat nogen form for organisk stof. Ikke desto mindre forventes søjlen at indeholde organisk stof hidrørende fra vækst af biomasse under indkøringsperioden, hvor denne og de andre søjle blev fødet med renset spildevand. Som følge heraf udviste også denne søjle en vis grad af sorption af biocider til filtermaterialet.



Figur 45 Lineært sammenhæng mellem fraktioner af organisk stof tilsat filtermaterialet (kvartssand) ved forsøgets start, og søjlens effektive elueringsvolumen (error bars viser 90% af peak bredden). Sorptionskurven for benzoisothiazolinone overlapper med den for methylisothiazolinone.

<u>Isothiazolinoner:</u> Methylisothiazolinone og benzisothiazolinone udviste ingen sorption i nogen af søjlerne, det vil sige, deres effektive elueringsvolumen var nul. I modsætning hertil blev octylisothiazolinone tilbageholdt i alle 3 kolonner. Mens det effektive elueringsvolumen i kolonnen uden spagnum var ganske lille, skulle der bruges omkring 12 gange mere vand til at eluere dette stof fra søjlen med 1% spagnum. Octylisothiazolinone er mere hydrofobt end de to andre isothiazolinoner, der samtidigt har højere vandopløselighed. Som følge heraf kan octylisothiazolinone opnå en større tilbageholdelse på det organiske stof, der findes i søjlerne. <u>Phenylureaer</u>: Diuron bandt væsentligt stærkere til filtermaterialet end isoproturon. Mens isoproturon ikke blev tilbageholdt i søjlen uden spagnum, skulle der allerede for denne søjle bruges et halvt porevolumen mere vand for at eluere diuron. For begge stoffer steg sorptionen med stigende indhold af spagnum, men stigningen var væsentligt mere udtalt for diuron end for isoproturon.

<u>Triaziner:</u> For terbutryn blev der set en sorptionsprofil, der modsvarede den for diuron. Det effektive elueringsvolumen for terbutryn steg med en faktor 6 når indholdet af spagnum steg til 1%.

<u>Triazoler</u>: Triazol fungiciderne tebuconazole og propiconazole udviste højere tilbageholdelse end nogen af de andre biocider. Det effektive elueringsvolumen steg op til en faktor 20 med øget indhold af organisk stof. Mens alle andre biocider så en klar korrelation mellem indholdet af spagnum og sorptionen, sås den største sorption (effektivt elueringsvolumen) for triazolerne ved 0,5% spagnum. Resultaterne stammer alene fra en enkelt kørsel af forsøget, og den statistiske signifikans af resultatet kan derfor ikke bedømmes.

<u>Mecoprop</u>: Mecoprop udviste ingen sorption til nogen af kolonnerne, det vil sige at det effektive elueringsvolumen var nul. Stoffets chlorophenoxy syre former binder let med vandmolekyler og undgår binding til f.eks. humus- og fulvosyre i filtermediets organiske fraktion.

Sorptionskoefficient

Sorptionskoefficienten normaliseret til filtermaterialets indhold af organisk stof (K_{OC}) blev beregnet for alle søjleforsøg ved brug af en metode fra Bronner and Goss (2011), der undersøgte sorption af adskillige organiske stoffer til jordsøjler. Ligningen, der blev anvendt til at bestemme K_{OC} , er vist nedenfor (ligning 9).

$$K_{OC} = \frac{V_{ret} - V_{void}}{m_{oc}}$$

Hvor m_{oc} er mængde af organisk stof i søjlen.

Idet den eksakte masse af biofilm i søjlerne ikke var kendt, blev K_{OC} alene beregnet ud fra søjlernes indhold af spagnum. m_{OC} for søjlen med kvartssand blev derfor antaget at være nul, og K_{OC} ikke beregnet for denne søjle. K_{OC} blev endvidere kun beregnet for søjler, der udviste sorption (effektivt elueringsvolumen > 0). Resultaterne er vist i Tabel 14 som $logK_{OC}$ for søjlerne med 0,5% og 1% spagnum.

Tabel 14 Organisk stof – vand fordelingskoefficient (<i>logKoc</i>) for biocider der udviste
sorption (<i>V_{eff}</i> > 0) til søjlerne med 0,5 og 1% spagnum.

Biocid	Organisk stof – vand fordelingskoefficient (<i>logKoc</i>)			
	Søjle	Søjle		
	med 0,5% spagnum	med 1% spagnum		
Terbutryn	2,00	1,93		
Benzisothiazolinone	0,33	0,48		
Octylisothiazolinone	2,02	1,99		
Diuron	1,99	1,94		
Tebuconazole	2,77	2,38		
Isoproturon	1,12	1,14		
Propiconazole	2,68	2,51		

Antages at langt hovedparten af sorptionen sker til spagnum -fraktionen, skal $logK_{OC}$ for de to søjler være ens, eller i alt fald ligne hinanden meget. Tages den generelle forsøgsusikkerhed i betragtning, samt at spagnum ikke er et homogent materiale, synes overensstemmelse i Tabel 14 at være god.

(Ligning 9)

Værdierne af de logaritmiserede sorptionskoefficienter normaliseret til indholdet af organisk stof ($logK_{OC}$) rangerede fra 0,33 for benzisothiazolinone til 2.77 for tebuconazole. Overordnet set udviser de to søjler sammenlignelige $logK_{OC}$ værdier for de enkelte biocider, hvilket supporterer hypotesen at sorption i denne type filtermateriale primært styres af indholdet af organisk stof. Rangordnes biociderne efter deres sorptionspotentiale fås: methylisothiazolinone, mecoprop < benzisothiazolinone < isoproturon < diuron, terbutryn, octylisothiazolinone < tebuconazole, propiconazole.

Stoffernes $logK_{OC}$ værdier (Tabel 3) blev korreleret til deres $logK_{OW}$ værdier (oktanol-vand fordelingskoefficient) og vist i Figur 46. Der er generelt set en lineær tendens mellem de to størrelser (R² = 0,7637),om end stoffernes $logK_{OC}$ værdier for de lipofile stoffer er lavere end deres $logK_{OW}$ værdier.



Figur 46 Relation mellem biocidernes logaritmiserede sorptionskoefficienter normaliseret til indholdet af organisk stof ($logK_{oc}$) og deres oktanol-vand fordelingskoefficient ($logK_{ow}$)

3.3.3 Omsætning i filterjord

Fjernelsen af biocider i jordfiltrene blev bestemt ved 10 forskellige hydrauliske overfladebelastninger hvor de hydrauliske opholdstider var tilstrækkelig til at sikre sorptionsligevægt mellem væske- og jordfasen. Fjernelsesgraden (%R) blev beregnet ved at sammenligne udløbskoncentrationer (C_{ud}) og indløbskoncentrationer (C_{ind}) for søjlerne (ligning 10).

$$\% R = \left(1 - \frac{C_{ud}}{C_{ind}}\right) 100$$
 (Ligning 10)

Ved anvendelse af den hydrauliske opholdstid (*HRT*), som bestemt ved de forskellige flowrater (overfladebelastninger), kunne kinetikdata bestemmes. Ud fra disse blev en førsteordens fjernelseskinetik og dennes ratekonstant (k) bestemt (ligning 11).

$$\ln\left(\frac{C_{ud}}{C_{ind}}\right) = -k \ HRT$$
 (Ligning 11)
En ideel førsteordens fjernelseskinetik skal give et lineært sammenhæng mellem $ln(C_{ud}/C_{ind})$ og *HRT*. Disse to parametre er plottet mod hinanden i Figur 47, hvoraf det ses, at antagelsen om førsteordens fjernelseskinetik er rimelig. Den beregnede førsteordens ratekonstant er vist i Tabel 15 sammen med fjernelsesgrader ved 2 forskellige hydrauliske opholdstider.



Figur 47 Naturlig logaritme til forholdet mellem indløbs- og udløbskoncentrationer af biocider ($In(C_{ud}/C_{ind})$) versus den hydrauliske opholdstid i søljerne (*HRT*) for en søjle med rent sand uden spagnum og med etableret biofilm. Alle stoffer blev simuleret med førsteordenskinetik som vist i ligning 11.

Tabel 15 Førsteordens ratekonstanter (k), halveringstid korrigeret til 12°C samt fjernelsesgrader ved to hydrauliske opholdstider for en søjle med rent sand uden spagnum og med etableret biofilm.

Disaid	r et1a	t½ [h]	Fjernels	esrate [%]
BIOCIO	<i>K</i> [n]	korrigeret til 12°C	<i>HRT</i> = 6h	<i>HRT</i> = 19h
Terbutryn	$0,008 \pm 0,003$	173	-2,5	18
Cybutryne	0,002 ± 0,0003	693	-2	18
Diuron	$0,004 \pm 0,002$	347	-14	-3
Tebuconazole	$0,014 \pm 0,004$	99	-3,5	4
Mecoprop	$0,002 \pm 0,002$	693	10	10
Isoproturon	$0,002 \pm 0,002$	693	-8,5	2
Propiconazole	0,030 ± 0,003	46	-4,5	34
Carbendazim	0,003 ± 0,002	462	-12	-7

Isoproturon, diuron og carbendazim blev kun fjernet i beskedent omfang i den undersøgte søjle (rent sand uden spagnum og med etableret biofilm). Generelt set fører en større hydraulisk opholdstid til mere tid til interaktion mellem biocidet og biofilmen i kolonnen, og følgelig til, at stoffet potentielt set kan nedbrydes mere. Det er derfor rimeligt at forvente større nedbrydningsrater for længere hydrauliske opholdstider. For triaziner og triazoler blev der fundet væsentligt større biologisk fjernelse i de viste forsøg. Fjernelsen steg fra 0% ved korte opholdstider til 40% og 64% for lange opholdstider for henholdsvis propiconazole og tebuconazole, og fra 0% til 20% for terbutryn og cybutryne. Mecoprop blev fjernet med omkring 10% ved den højeste opholdstid.

Den større fjernelse af triazoler i forhold til triaziner kan muligvis forklares ved større sorption af førstnævnte, og dermed mere tid til interaktion af propiconazole og tebuconazole med biofilmen. Mecoprob udviste ingen sorption til den undersøgte søjle, hvilket kan bidrage til at forklare den lave fjernelsesgrad. Et tidligere studie af Escolà Casas og Bester (2015) viste fjernelsesgrader uafhængig af den hydrauliske opholdstid på 20% for propiconazole og 50% for tebuconazole.

3.4 Alger i regnvandssøer

3.4.1 Biocider målt i de 10 regnvandssøer

De 10 søer blev analyseret for biocider samtidigt med udtagning af algeprøver og herefter 2 gange med cirka 3 ugers interval (afsnit 0). Resultaterne ses i Tabel 16 samt i Figur 48. Methylisothiazolinone, benzisothiazolinone, iodocarb, isoproturon og cybutryne, irgarol 1051 var i alle 30 målinger under detektionsgrænsen. Motorvejssøerne indeholdt generelt de laveste koncentrationer af biocider, men der blev systematisk fundet tebuconazole, propiconazole og dichlorooctylisothiazolinone, samt sporadisk mecoprop, diuron, og octylisothiazolinone. Stort set alle fundene var på encifrede nanogram koncentrationer. Det er nærliggende at antage, at disse stoffer har fundet vej til søerne via atmosfærisk deposition på motorvejene, der bidrager med vand til søerne, eller muligvis stammer fra malinger på veje og skilte.

Sø	Tidspunkt	МІ	BIT	МСРР	IP	IPBC	DR	ТВ	IRG	TBU	PPZ	CD	ΟΙΤ	DCOIT
B1	August	< LOD	< LOD	21,9	11,5	< LOD	16,4	58,9	< LOD	7,0	14,0	70,6	< LOD	4,2
	September	< LOD	< LOD	21,4	6,1	< LOD	9,0	45,9	< LOD	8,0	14,0	77,7	2,9	4,8
	Oktober	< LOD	< LOD	10,7	5,5	< LOD	6,9	27,8	< LOD	7,0	10,0	44,1	8,9	8,1
B2	August	< LOD	< LOD	16,3	< LOD	< LOD	9,8	2,4	< LOD	15,1	15,9	10,9	< LOD	15,3
	September	< LOD	< LOD	16,7	< LOD	< LOD	6,6	< LOD	< LOD	5,4	5,6	6,5	3,3	4,4
	Oktober	< LOD	< LOD	14,6	< LOD	< LOD	8,9	3,1	< LOD	5,2	4,9	6,6	< LOD	5,7
B3	August	< LOD	< LOD	16,0	< LOD	< LOD	14,7	10,5	< LOD	26,0	27,7	13,4	4,7	31,3
	September	< LOD	< LOD	28,2	< LOD	< LOD	8,3	5,9	< LOD	23,9	25,5	10,7	< LOD	5,0
	Oktober	< LOD	< LOD	18,9	< LOD	< LOD	7,9	10,1	< LOD	18,2	20,6	8,3	23,7	26,5
11	August	< LOD	< LOD	22,1	< LOD	< LOD	7,1	2,2	< LOD	33,6	44,3	15,3	5,3	17,9
	September	< LOD	< LOD	22,5	< LOD	< LOD	8,5	6,3	< LOD	28,6	37,6	17,5	< LOD	3,7
	Oktober	< LOD	< LOD	25,5	< LOD	< LOD	11,2	4,5	< LOD	55,6	39,7	13,8	10,9	8,3
12	August	< LOD	< LOD	7,7	< LOD	< LOD	6,0	< LOD	< LOD	4,9	7,1	< LOD	< LOD	5,5
	September	< LOD	< LOD	16,3	< LOD	< LOD	10,3	3,9	< LOD	5,7	5,2	< LOD	< LOD	6,9
	Oktober	< LOD	< LOD	27,8	< LOD	< LOD	9,0	2,6	< LOD	7,4	4,8	< LOD	10,6	28,3
13	August	< LOD	< LOD	23,6	< LOD	< LOD	6,0	10,3	< LOD	7,8	9,0	48,8	< LOD	16,9
	September	< LOD	< LOD	14,7	< LOD	< LOD	6,1	9,0	< LOD	5,1	6,1	37,9	< LOD	6,3
	Oktober	< LOD	< LOD	13,5	< LOD	< LOD	9,0	21,8	< LOD	7,3	11,5	44,4	11,6	13,5
BI	August	< LOD	< LOD	56,7	< LOD	< LOD	113,3	36,5	< LOD	30,1	21,3	47,1	< LOD	33,6
	September	< LOD	< LOD	38,6	< LOD	< LOD	73,7	37,5	< LOD	19,5	17,2	36,7	-	19,2
	Oktober	< LOD	< LOD	37,2	< LOD	< LOD	57,7	37,0	< LOD	17,2	13,5	38,1	-	14,6
M1	August	< LOD	53,1	< LOD	< LOD	5,7	3,0	< LOD	10,7	34,2				
	September	< LOD	< LOD	4,2	< LOD	2,0	1,9	< LOD	-	9,7				
	Oktober	< LOD	4,5	< LOD	< LOD	3,7	< LOD	< LOD	-	3,5				
M2	August	< LOD	< LOD	1,5	< LOD	4,0	1,3	< LOD	2,8	6,7				
	September	< LOD	3,1	< LOD	< LOD	3,3	< LOD	< LOD	< LOD	3,4				
	Oktober	na	na	na	na	na	na							

Tabel 16 Biocider i de 10 søer. Værdier markeret med < LOD har været under detektionsgrænsen. Alle enheder i ng L⁻¹.

Sø	Tidspunkt	МІ	BIT	МСРР	IP	IPBC	DR	тв	IRG	TBU	PPZ	CD	ΟΙΤ	DCOIT
M3	August	< LOD	3,0	2,2	11,1	4,7	40,1							
	September	< LOD	< LOD	8,1	< LOD	< LOD	4,9	< LOD	< LOD	4,7	2,2	< LOD	< LOD	8,3
	Oktober	< LOD	5,8	< LOD	< LOD	5,2	2,7	< LOD	< LOD	3,7				
LOE) ng/L	129,9	3,5	1,3	4,2	1,7	0,3	1,1	0,3	0,6	0,3	1,7	2,8	2,2
LOC	۵ ng/L	432,9	11,7	4,3	14,1	5,7	0,9	3,7	0,9	2,0	1,0	5,8	9,3	7,4

MI: Methylisothiazolinone; BIT: Benzisothiazolinone; OIT: Octylisothiazolinone; DCOIT: Dichlorooctylisothiazolinone; CD: Carbendazim; IPBC: Iodocarb; TB: Terbutryn; IRG: Cybutryne, Irgarol 1051; IP: Isoproturon; DR: Diuron; TBU: Tebuconazole; PPZ: Propiconazole; MCPP; Mecoprop.



Figur 48 Biocider i de 10 søer jf. Tabel 16

To biocider, tebuconazole (TBU) og 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazoline-3-one (DCOIT), blev fundet i alle prøver fra alle bassiner (Tabel 16). Fungicidet tebuconazole var til stede i prøverne i koncentrationer fra 2 til 55,6 ng L⁻¹ mens det bredspektrede biocid 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazoline-3-one var til stede i fra 3,4 til 40 ng L⁻¹. Propiconazole (PPZ), diuron (DR) og mecoprop (MCPP) blev fundet i næsten alle prøver (henholdsvis 27, 26 og 24 ud af 29) i koncentrationer op til 44,3 ng L⁻¹, 113,6 ng L⁻¹ og 56,7 ng L⁻¹. Carbendazim (CD) blev fundet systematisk i 6 af søerne (op til 77,7 ng L⁻¹), og en enkelt gang i en syvende sø. Nærmere betegnet blev carbendazim fundet systematisk i alle urbane søer på nær I2 (Figur 3, Tabel 1). Den enkelte måling i den syvende sø var en af de tre motorvejssøer (M3). Terbutryn (TB) blev fundet stort set systematisk i alle søer på nær de 3 motorvejssøer (op til 58.9 ng L⁻¹) mens noctylisothiazolinone (OIT) blev fundet sporadisk i alle 10 søer på nær sø BI (op til 23,7 ng L⁻¹). Isoproturon (IP) blev fundet systematisk i en enkelt sø (B1, 5,5 – 11,5 ng L⁻¹), men kunne ikke påvises i de 9 andre søer. Methylisothiazolinone (MI), benzisothiazolinone (BIT), butylcarbamate (IPBC) og cybutryne, irgarol 1051 (IRG) blev ikke fundet i nogen af prøverne.

Generelt var der en tendens til, at motorvejssøerne havde de laveste koncentrationer af biocider. Idet der formentlig ikke anvendes biocidholdige materialer til konstruktion af motorveje eller afmærkninger herpå, må fundet af biocider i disse søer tilskrives atomsfærisk disposition. I 2011-12 undersøgte Bollmann et al. (2014) en af de søer, der også er med i nærværende undersøgelse, nemlig B1 (Figur 3, Tabel 1). Studiet af regnvandssø B1 blev udført med en ganske høj tidslig opløsning, hvor 191 vandføringsvægtede prøver blev analyseret af det afstrømmede regnvand, før det løb ind i søen. Undersøgelsen dækkede på denne måde 32% af alt regnvand tilført søen over en 8 måneders periode. Biociderne der forekom i højeste middelkoncentrationer var carbendazim og terbutryn (45 and 52 ng L⁻¹), mens andre biocider forekom i middelkoncentrationer under 10 ng L⁻¹. Sammenlignes disse tal med middelkoncentrationerne målt i selve søen i nærværende projekt (Tabel 16), ses samme tendens for regnvandssø B1, selvom nærværende undersøgelse dækker langt færre målinger. I denne sammenhæng skal det bemærkes, at prøverne i nærværende projekt blev udtaget fra selve søen, hvilket betyder, at tilløbskoncentrationerne er udlignet på grund af den hydrauliske udligning der sker i selve søens volumen. De 3 udførte stikprøver vurderes derfor at give et rimeligt billede af søernes middelbelastning, men kan ikke fortælle om mulige spidsbelastninger.

3.4.2 Bentiske diatoméer

Samlet set blev der identificeret 49 diatomé-slægter i de undersøgte søer. Tabel 17 viser hvilke slægter der blev fundet i de enkelte søer, og i hvor mange af de 5 prøvetagningssteder (Figur 4), de var til stede. For knap halvdelen af kombinationerne slægt / sø, var en slægt jævnt til stede i hele søen (defineret som fund i 4 – 5 prøvetagningssteder) (Figur 49). Syv slægter var jævnt fordelt i alle søer (Tabel 17: *Fragilaria*; *Gomphonema*; *Navicula*; *Nitzschia*; *Planothidium*; *Sellaphora*; *Synedra*). Syv andre slægter blev fundet sjældent (defineret som fund i 1 – 2 af søerne) (Tabel 17: *Achnanthidium* (& *Rossithidium*); *Anomoeoneis*; *Cosmioneis*; *Cyclostephanos* og *Ctenophora*; *Staurosirella*; *Tabellaria*). Af disse var *Anomoeoneis*, *Cyclostephanos* og *Ctenophora* systematisk til stede i én af søerne (de to første i M1, den sidste i M2), men ikke eller kun sjældent til stede i andre. Det er endvidere værd at bemærke, at disse slægter alene var til stede i motorvejssøer og ikke i urbane regnvandssøer.

Det højeste antal, 40 slægter, blev fundet i motorvejssøen M2, tæt fulgt af I2 (39 slægter), BI (38 slægter), M1 (37 slægter) og B2 (36 slægter). Generelt fordeler antallet af slægter sig jævnt på søtype (defineret som bolig, industri, og motorvej), og der var ikke en statistisk signifikant forskel i artsrigdom mellem søer i disse kategorier. I forhold til dominante slægter blev der fundet nogenlunde lige mange i alle typer søer: 23-27 i regnvandsøer med motorvej som opland, 23-24 søer med beboelse som opland, 15-23 i søer med industri som opland og 28 i søen med blandet industri og beboelse.

Det laveste antal slægter fundet i en eller flere prøvetagningssteder i en regnvandssø var 25 i I1. Denne sø modtager afstrømning fra et industriområde. En af grundene til, at sø I1 skilte sig ud fra de andre søer i form af artsrigdom kunne være, at denne sø er ældre end de andre, og der derfor muligvis har indstillet sig en stabil og tilpasset diatomé-flora. På den anden side er søen lokaliseret i et industriområde, hvor der kan forventes en større variation i indholdet af forurenende stoffer end i en sø i et boligområde, for ikke at tale om en sø, der modtager afstrømning fra en motorvej. En anden grund til det relativt lave antal slægter kunne være, at denne sø har den laveste hydrauliske opholdstid, altså at den har et lille forhold mellem volumen og oplandsareal. Dette fører alt andet lige til en højere forureningsbelastning per arealenhed sø, hvilket også kunne bidrage til, at kun de mest tilpasningsdygtige diatoméer kan etablere sig i denne sø.

Den fundne diversitet i diatomé-slægter kunne endvidere skyldes, at søens vandkvalitet ændrer sig over året, for eksempel i form af saltindholdet i søer, der modtager vand fra saltede vejarealer. Det er velkendt, at diatomé-sammensætningen i en sø responderer på ændrede forhold i deres miljø (Kelly et al., 1998; Gonzalo and Fernandez, 2012). Endvidere kan forurenende stoffer i sediment ligefrem føre til større diversitet i diatomé-slægter. Således undersøgte Cattaneo et al. (2011) diatomé-samfundene i sediment fra søer forurenet med tungmetaller og fandt, at de mest forurenede sedimenter indeholdt den største diatomé-diversitet. Et relativt stort antal diatomé-slægter kunne derfor skyldes, at en given sø oplever et relativt stort spænd af miljøforhold over året, eller endog en generelt høj belastning med forurenende stoffer.

Set i forhold til tidligere studier af diatomé-samfund i sedimenter fra naturlige søer, er diatomésamfundene i regnvandssøer mindst ligeså diverse som de naturlige søer. For eksempel fandt Chen et al. (2012) 24 diatomé-slægter i sediment fra en noget større og dybere sø (3 m) i Kina. Undersøgelser af 28 Canadiske søer af forskellig størrelse og dybde afslørede totalt set 29 slægter (Dixit and Dickman, 1986). I et studie fra Utah, USA, fandt Javakul et al. (1983) 36 slægter i Utah Lake. De så ikke alene på det øverste sedimentlag, men også på dybere lag, og dette studie dækkede derfor et tilsvarende større tidsvindue. De fleste slægter fundet i disse studier var de samme som blev fundet i nærværende studie, hvilke peger i retning af, at regnvandssøer – i det mindste fra et meget overordnet diatomé-perspektiv – er ret sammenlignelige med naturlige søer. Samlet set kan man derfor næppe slutte noget om søens miljøtilstand henholdsvis dens forureningstilstand, f.eks. målt som biocidbelastning, ud fra diatomédiversiteten målt alene som antal af fundne slægter.

	B1	B2	BI	l1	12	13	M1	M2	M3	Sum
Achnanthes	5	1	4	5		3	3	3	2	26
Achnanthidium (&Rossithidium)			2							2
Amphora		5	5		5	5	5	5	5	35
Anomoeoneis							5			5
Asterionella	5			5				2		12
Caloneis	1		1		1		4	4	4	15
Cocconeis	1	5	5	1	5	5	5	5	5	37
Cosmioneis								1		1
Craticula	4	5	5	3	5	5	4	4	3	38
Cyclostephanos							5			5
Cyclotella	5	1	5		5	5	5	5		31
Cymatopleura	3	5	5	1	4	4	5	5	5	37
Cymbella			3		2	3	5	3		16
Ctenophora							1	5		6
Diatoma	1	1	5		4	5	5	5	3	29
Diploneis	1		2	2		2		1		8
Encyonema	4	5	5	1	5	5	5	5	5	40
Epithemia		2	3	1	2		5	3	5	21
Eunotia	5	1	1		4	5	3	5	3	27
Fallacia		4	4		3		3		5	19
Fragilaria	5	5	5	5	5	4	5	5	5	44
Fragilariaforma		1			2		3	1		7
Frustulia		2		3	1		2		1	9
Gomphonema	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Gyrosigma	5	5	5		5	5	5	5	5	40
Hantzschia	4	1	1	2	1	2	2	1	4	18
Hippodonta	5	5	5		5	5	5	5	4	39
Lemnicola		2	2	5	5	2	5		4	25

Tabel 17 Diatomé-slægter i de undersøgte søer. Tallet i kolonnerne angiver i hvor mange af de 5 prøver fra hver sø, en slægt blev fundet

	B1	B2	BI	l1	12	13	M1	M2	M3	Sum
Luticola	5	4	5	5	3	5	3	2	5	37
Melosira					5		5	5		15
Meridion	2	1	4		1			2		10
Navicula	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Neidium	5	4	4	5	1	2		4	2	27
Nitzschia	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Pinnularia	5	5	4	5		5	5	5	2	36
Placoneis		5	5			1				11
Planothidium	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Rhoicosphenia		5	5		5	4	5	5	5	34
Rhopalodia		2			1	1			5	9
Sellaphora	5	5	5	5	4	5	4	5	5	43
Stauroforma				1	1	1				3
Stauroneis	5	5	3	5	2	5		2		27
Staurosira	4		4		1	1	3	3		16
Staurosirella								1		1
Surirella	5	5	5	5	5	3	5	5	5	43
Synedra	5	5	5	5	5	5	5	5	2	42
Tabellaria	3									3
Tabularia	5	5	5	3	5	5	5	5	5	43
Tryblionella		5	5		5	5	3	5	5	33
Uidentificeret	1	2	1		2	1		2	_	9
Sum	124	134	153	93	135	134	158	154	129	1214
Antal slægter fundet i en eller flere prøvetagningssteder i en sø	31	36	38	25	39	35	37	40	31	31



Figur 49 Hyppighed af diatomé-fund i de 5 prøvetagningssteder i de 9 søer

Sammenligning af de 5 prøvetagningssteder i en sø

Figur 50, Figur 51 og Figur 52 giver et mere detaljeret billede af diatomé-samfundene, i form af den relative hyppighed af diatomé-slægter fordelt på de 5 prøvetagningssteder i de 9 søer.

De 5 prøvetagningssteder i en regnvandssø blev sammenlignet indbyrdes for at se hvorvidt prøvetagningsstederne havde diatomé-samfund, der indbyrdes adskilte sig signifikant. Rent visuelt virker de 5 prøvetagningssteder ret ens med enkelte, mindre forskelle (Figur 50, Figur 51, Figur 52). Som en af disse forskelle kan nævnes, at *Fragilaria* i sø M1 kun var dominant i 1 af de 5 lokaliteter (28.9% versus 1.7 – 4.4% i de andre prøvetagningssteder). Om en sådan forskel skyldes lokale variationer i søen, f.eks. skygge fra planter eller strømningsforhold, eller om der er tale om tilfældige udsving, vides ikke.

For mere præcist at undersøge graden af similaritet mellem prøvetagningssteder i en regnvandssø, blev diatomé-dataerne sammenlignet med Bray-Curtis similaritetsindeks, hvor 0 betyder ingen similaritet og 1 betyder fuldstændig similaritet. Indekset varierede mellem 0,57 og 0,92 og tydede generelt på en høj grad af similaritet mellem de 5 prøvetagningssteder. Det laveste similaritetsindeks blev fundet for M1, primært forårsaget af den før diskuterede forekomst af Fragilaria.



Figur 50 Diatomé-fordeling i sediment fra søerne B1, B2 og BI



Figur 51 Diatomé-fordeling i sediment fra søerne I1, I2 og I3



Figur 52 Diatomé-fordeling i sediment fra søerne M1, M2 og M2

Sammenligning af regnvandssøerne

På grund af den høje grad af similaritet mellem de enkelte prøvetagningssteder i en sø, blev disse samlet og hver sø karakteriseret ved én fordeling af relativ diatomé-hyppighed per sø (Figur 53). Denne blev beregnet som gennemsnittet af de relative hyppigheder fundet i de 5 prøvetagningssteder. Bray-Curtis similaritetsindekset for de dette datasæt varierede mellem 0,44 og 0,87 for søerne indbyrdes, hvilket tydede på moderat til høj similaritet søerne imellem. De største dissimilariteter blev fundet ved sammenligning af henholdsvis B1 og I1 med de tre motorvejssøer (M1, M2, M3) (0,46 – 0,55). Andre lave similariteter var mellem B1 og B2 (0,50), B2 og I1 (0,46), samt I1 og I2 (0.44). ANOSIM test viste, at dissimilaritet mellem regnvandsøerne var lille (globalt R=0,242). Nogle tydelige forskelle kunne observeres. Således var motorvejssøerne M1, M2 og M3 som gruppe væsentligt forskellig fra søerne, der fik vand fra beboelsesoplande (B1 og B2) (p=0,002), såvel som fra søerne med industrioplande (I1, I2, I3) (p=0,001). Forskellen mellem søer i beboelsesoplande og industrioplande var ikke signifikant (p=0,087).

De hyppigst forekommende slægter (Figur 53) var *Navicula* og *Nitzschia*, der tilsammen udgjorde en tredjedel af alle fundne diatoméer (henholdsvis 18,5% og 15,5%). Hver slægt udgjorde i middel per sø henholdsvis 12 – 22% og 11 – 20% af det samlede antal individer og summen af disse to slægter udgjorde 28 – 38%. Disse slægter fandtes endvidere i alle prøvetagningssteder i alle søer. *Navicula* og *Nitzschia* er almindeligt forekommende i silt og sediment, også ved pH værdier under 7 (Kelly, 2000), hvilket ikke er ualmindeligt for sediment i denne type sø (se afsnit 3.1, hvor sedimentet blev fundet til at have pH værdier mellem 5,8 og 7,1). Endvidere er disse slægter meget artsrige (Spaulding et al., 2010), og der er derfor alt andet lige større sandsynlighed for, at de indeholder specier med tolerans overfor et stort antal parametre.

I alt fandtes 15 af de identificerede slægter i en eller flere prøvetagningssteder i alle 9 søer, og udgjorde tilsammen i gennemsnit 71% af det samlede antal diatoméer (slægter: *Cocconeis, Craticula, Cymatopleura, Encyonema, Fragilaria, Gomphonema, Hantzschia, Luticola, Navicula, Nitzschia, Planothidium, Sellaphora, Surirella, Synedra, Tabularia*). For den enkelte sø udgjorde summen af disse 15 slægter 65 – 77% af det samlede individantal.

Flere andre slægter end *Navicula* og *Nitzschia* blev fundet med stor hyppighed (mere end 10% af det samlede individtal): *Amphora* i B2, *Cocconeis* i alle søer bortset fra M1, B1 og I1, *Synedra* i I1 og *Cyclotella* i B1 og I3. Specier af *Cyclotella* kan være planktoniske, og disse slægters forekomst kan derfor skyldes vækst i vandfasen med efterfølgende henfald og akkumulering på søens bund. Nogle få andre planktoniske slægter blev fundet, om end kun med lav hyppighed: *Asterionella* i B1 udgjorde 8,9% af det samlede individantal, mens antallet var 0,3% og 0,6% i henholdsvis M2 og I1. *Tabellaria* udgjorde 0,3% i B1 og *Cyclostephanos* udgjorde 1,6% i H1.

Til sammenligning med tidligere studier, fandt Chen et al. (2014) ved undersøgelse af en kinesisk sø stærkt forurenet med tungmetaller og hårdt belastet med næringssalte, at det øverste sedimentlag var domineret af specier indenfor slægterne *Cyclotella* og *Nitzschia*. En del specier indenfor disse slægter er tolerante overfor eutrofiering og tungmetaller. Ved undersøgelse af en anden kinesisk, hypereutrof sø fandt Ruping and Dickman (1991) de samme slægter, såvel som *Melosira*, som de mest dominante. Laird et al. (2013) undersøgte 10 mindre søer af varierende dybde fra den nordlige del af det centrale Canada. De observerede, at der var store variationer søerne imellem, i forhold til hvilke taxa der var dominante. I de øverste sedimentlag var det typisk slægterne *Staurosirella, Staurosira, Achnanthidium, Navicula, Brachysira, Chamaepinnularia, Naviculadicta, Nitzschia, Pinnularia, Discostella og Aulacoseira*, der blev fundet i stort individantal.

Sammenligning mellem disse studier fra naturlige søer og nærværende undersøgelse viser, at en del af de taxa, der forekom hyppigt i regnvandssøerne, også forekommer hyppigt i naturlige søer. Hvorvidt en sådan similaritet blot er en konsekvens af naturlig diatomé-variabilitet i forhold til søernes morfologi, eller om de er en konsekvens af et eventuelt højere forureningsniveau i nogle af de naturlige søer, vides ikke.



Figur 53 Diatomé-fordeling i sediment fra alle søer – gennemsnit af de 5 prøvetagningssteder per sø

Figur 54 viser en klassisk Bray-Curtis cluster-analyse baseret på den log-tranformerede relative hyppighed af de 49 diatomé-slægter. Analysen viser en vis gruppering af søer i forhold til det opland, de modtager afstrømmet regnvand fra. To af søerne med industrielt opland (I2 og I3) samt søen med blandet industri og bolig som opland (BI) viste den største similaritet og grupperede sammen. Den sidste af søerne med industrielt opland, I1, var meget forskellig fra de andre oplande med industri. Som tidligere diskuteret (side 78), kunne denne forskel være relateret til, at søen både er den ældste, har den største hydrauliske (og måske forurenings-mæssige) belastning per arealenhed, og den korteste hydrauliske opholdstid.



Figur 54 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for diatomé-sammensætning af de undersøgte regnvandssøer. Diagrammet er baseret på den log-tranformerede relative hyppighed

To af motorvejssøerne (M1 og M2) var ligeledes relativt ens, ligesom den sidste motorvejssø og den ene sø i et boligkvarter (B2) var det. De to søer, der skilte sig mest ud, var B1 og I1. Alt i alt ser billedet altså noget blandet ud, når man vurder grupperingerne i forhold til søernes oplandstyper. Dette skyldes formentlig at diatomé-samfundenes sammensætning i søerne snarere er styret af andre forhold, rangerende fra deres geografiske placering til den vandkvalitet, de modtager. Således skal det for eksempel bemærkes, at de to motorvejssøer der clustrer (M1 og M2) begge ligger relativt tæt på hinanden nord for Limfjorden, mens f.eks. I2, I3 og BI alle ligger relativt tæt på hinanden i Aarhus.

Påvirkninger

Regnvandssøer er designet til håndtering af afstrømmet regnvand, der har opsamlet en lang række forurenende stoffer fra overfladerne som vandet strømmer af fra (Bannerman et al., 1993; McLeod et al., 2006; Hvitved-Jacobsen et al., 2010). Afhængig af hvilket stof eller stofgruppe der er tale om, varier koncentrationerne adskillige størrelsesordenener såvel mellem den enkelte afstrømningshændelse som mellem de enkelte regnvandssøer (Leisenring et al. 2014; Vollertsen et al., 2012). For eksempel varierer næringssalte relativt lidt i forhold til for eksempel bakterier. Denne forskel skyldes kilderne til de forskellige typer forurening, hvor næringssalte primært kommer til overfladen via atmosfærisk deposition af jord eroderet fra landbrugsarealer, mens bakterier typisk kommer fra fejlkobling af spildevand til regnvandssystemet. På tilsvarende har indholdet af biocider i regnvand ledt til en regnvandssø tidligere været vist at variere 1-2 størrelsesordener over tid (Bollmann et al., 2014). Sluttelig skal det bemærkes, at stofindholdet i regnvand ikke er konstant under en afstrømningshændelse, men ligeledes ofte varier 1-2 størrelsesordener (Bollmann et al., 2014; Sun et al., 2015).

Kun ganske få undersøgelser har adresseret bentiske diatoméeres sensitivitet overfor biocider, og udvalget bliver yderligere begrænset, når der ses på diatomé-samfunds sammensætning i søer af forskellig art. Der har været gennemført en række laboratorieundersøgelser af pesticiders toksicitet overfor forskellige specier af diatoméer samt diatomé-biofilm dyrket i laboratoriet. Således viste Moisset et al. (2015) at diuron i koncentrationer på 1 og 10 µg L⁻¹ påvirkede fotosynteseaktivitet og ændrede vækstforløbet for visse diatomé-specier. Proia et al. (2011) viste en øget dødelighed af diatoméer i biofilm og inhiberet fotosyntese ved diuron koncentrationer på 15 µg L⁻¹. Rimet and Bouchez (2011) udførte mesokosmosundersøgelser af diatoméer i en flod, hvor de blandt andet undersøgte diuron og terbutryn. De så på langtidskoncentrationer på $1.11 - 3.01 \mu g L^{-1}$ og korttidskoncentrationer på 20.25 – 29.50 µg L⁻¹. De fandt at disse koncentrationer førte til en højere hyppighed af forureningstolerante slægter så som *Navicula, Nitzschia* og *Cocconeis*. Selv om biocidkoncentrationerne anvendt i de ovenfor nævnte studier er 2-

3 størrelsesordener højere end hvad der typisk forekommer i urbane regnvandssøer, kan det ikke udelukkes, at en højere forekomst af disse slægter i de i nærværende projekt undersøgte søer kan relateres til forurening og muligvis til forurening med biocider.

I vandløb og floder benyttes diatomé-arter som indikator for vandkvalitet, og deres samfund har derfor været studeret grundigt (Kelly et al., 1998; Gonzalo and Fernandez, 2012). Diatomé-samfund i sedimenter fra naturlige eller konstruerede småsøer har, så vidt vi ved, ikke været undersøgt. Vandløb og floder er noget forskellige fra småsøer og det er derfor ikke umiddelbart simpelt at overføre resultater fra studier heraf til diatomé-samfund i småsøer.

For at undersøge, om der kan ses en trend mellem diatomé-samfundenes sammensætning i regnvandssøer og forskellige målte kemiske og fysiske parametre, er der udført en DCAanalyse af den relative hyppighed af de fundne diatoméer i de ni søer (Figur 55). På samme vis som cluster-diagrammet, viste DCA-diagrammet en gruppering af søerne I2, I3 og BI, hvilket måske i et vist omfang kan skyldes deres geografiske nærhed.



Figur 55 DCA-analyse for diatomé-sammensætning af de undersøgte regnvandssøer

Ingen af DCA-akserne havde en synderlig høj eigenværdi, og akse 1 kunne således blot forklare 25% af variationen i datasættet, mens akse 2 kunne forklare lige knap 10%. Akserne 3 og 4 kunne forklare henholdsvis 5% og 4% af variabiliteten. Kun DCA-akse 1 er derfor efterfølgende benyttet til at korrelere til fysiske og kemiske parametre. Spearman's rank-korrelation mellem DCA-analysens akse 1 og søernes overfladeareal, volumen, middeldybde, oplandsareal, reduceret areal og hydraulisk middelopholdstid (Tabel 1), samt middelkoncentrationer af biocider (Tabel 16) blev testet. Akse 1 blev fundet at korrelere signifikant (p<0,05) med biociderne mecoprop (MCPP, $r_s=0.73$), terbutryn (TB, $r_s=0.80$) og propiconazole (PPZ, $r_s=0.77$). Dette resultat indikerer, at disse biocider kan have påvirket diatomé-samfundenes sammensætning i de undersøgte regnvandssøer. Generelt blev de laveste biocidkoncentrationer målt i regnvandssøerne der modtog vand fra motorveje (M1, M2, M3), mens søerne der modtog vand fra industriområder, det blandede industri/bolig område samt et af boligområderne (I1, I2, I3, BI, B1) havde koncentrationer der var flere gange højere (Tabel 16). Det skal slås fast, at den observerede relation mellem diatomé-samfundenes sammensætning og biocidkoncentrationer er baseret på en svag forklarende parameter med en eigenværdi på blot 0,25, og man skal derfor være varsom med at drage en entydig konklusion.

Alt i alt viser analysen, at diatomé-samfundenes sammensætning i de 9 regnvandssøer muligvis påvirkes af oplandets karakteristika og/eller deres geografiske placering i landet. Samtidigt kan det ikke udelukkes, at diatomé-samfundenes sammensætning påvirkes af biociderne, der ledes med det afstrømmende regnvand til søerne. Det kan være vanskeligt med sikkerhed at fastslå en årsags-virkningssammenhæng ud fra datasættet, da der også er korrelation mellem oplandenes karakteristika og de koncentrationer af biocider, der forekommer i vandet afstrømmet herfra. Samtidigt skal det erindres, at der også forekommer andre forurenende stoffer i afstrømmet regnvand, stoffer der ligeledes kan påvirke diatomé-samfundene, f.eks. tungmetaller som kobber eller organiske mikroforureninger som PAH'er.

3.4.3 Fytoplankton

Der blev samlet identificeret 105 taxa i de 10 søer der indgik i undersøgelsen. Tabel 18 viser hvilke taxa, der blev fundet i de enkelte søer, og i hvor mange af de 5 prøvetagningssteder, de var til stede (Figur 4). I 17% af kombinationen taxon / sø blev et taxon fundet jævnt fordelt i hele søen (defineret som fund i 4 ud af 5 prøvetagningssteder) (Figur 56). Ingen af de 105 taxa var til stede i alle søer, 1 taxon var til stede i 9 af 10 søer (*Cryptomonas*) og 2 taxa var til stede i 8 af de 9 søer (*Scenedesmus* og *Trachelomonas*). Over halvdelen af taxa (67) var kun sporadisk til stede (defineret som fund i 1 eller 2 prøvetagningssteder i en sø).

Der var stor variation mellem hvor mange taxa der blev fundet i de enkelte søer. Den taxarigeste sø var B1 med 60 taxa. Denne sø havde også langt den største hyppighed af jævnt fordelte taxa (fund i 4 eller 5 steder i søen). De mest taxafattige søer var I1 (9 taxa) og M3 (10 taxa). Som gruppe betragtet, var motorvejssøerne de mest taxafattige med et gennemsnit af 20 taxa per sø. En t-test, viste at forskellen i taxarigdom mellem motorvejssøer og søer der modtager vand fra beboelseskvarterer var statistisk signifikant (p: 0,042), mens forskellene mellem andre grupper ikke var det.

Regnvandssø I1 var også den mest taxafattige med hensyn til bentiske diatoméer (afsnit 3.4.2), og taxafattigheden af fytoplankton kunne skyldes nogle af de samme forhold som diskuteret for bentiske diatoméer. Årsagerne til regnvandssø M3 var taxafattig og B1 var taxarig synes ikke umiddelbart at have en tilsvarende forklaring.

Klassifika	ation	B1	B2	B 3	BI	11	12	13	M1	M2	M3	Sum
Række	Chlorophyceae											
Slægt	Ankyra		5		1							6
Slægt	Coenochloris		1									1
Slægt	Pediastrum	5	5	5	5		1	4		1		26
Slægt	Scenedesmus	5	3	5			2	5	3	3	1	27
Slægt	Chlamydomonas	5		1	5		1	5				17
Slægt	Pandorina						5					5
Slægt	Pteromonas						1					1
Slægt	Tetrastrum	5		2	5		3	4				19
Slægt	Monoraphidium	5			5	1	3	5		1	1	21
Slægt	Volvox			4				5	1	5	5	20
Orden	Chlorococcales	5		4	5							14
Slægt	Coelastrum	1		4	3			5				13
Slægt	Raphidocelis			4	5			3				12
Slægt	Westella			4								4
Slægt	Kirchneriella	5		5	5			1				16
Slægt	Tetraedron	5		2	1			5				13
Slægt	Stauridium	5		4	3			1				13
Slægt	Treubaria	1			1							2
Orden	Volvocales	5			5			5		1		16
Slægt	Selenastrum				5							5
Slægt	Pseudosphaerocystis							4				4
Slægt	Sphaerocystis/eutetramorus							1				1
Slægt	Phacotus	5								4		9
Række	Trebouxiophyceae		· <u>····</u>		· <u>····</u>							
Slægt	Crucigenia	3	1	4								8

Tabel 18 Fytoplanktontaxa i de undersøgte søer. Tallet i kolonnerne angiver i hvor mange af de 5 prøver fra hver sø, et taxon blev fundet

Klassifika	ation	B1	B2	B 3	BI	11	12	13	M1	M2	M3	Sum
Slægt	Crucigeniella	5	5	4				2				16
Slægt	Chlorella		5	5				5				15
Slægt	Oocystis	3	5	4	2			5			2	21
Slægt	Botryococcus	3	1	1								5
Slægt	Actinastrum	2					2	4				8
Slægt	Dictyosphaerium	5			3		4	4				16
Slægt	Didymocystis	5		5	1	5		5				21
Slægt	Micractinium			1	5			1				7
Slægt	Quadricoccus	5		1				1				7
Slægt	Dichotomococcus			1								1
Slægt	Lagerheimia	5			5			5				15
Slægt	Siderocelis	5			5							10
Slægt	Coronastrum	5										5
Slægt	Closteriopsis	5										5
Slægt	Koliella	5										5
Række	Cyanophyceae											
Slægt	Chroococcus	5	3	4		2						14
Orden	Chroococcales	5	4	5								14
Slægt	Aphanizomenon	5	3	4								12
Slægt	Planktothrix		4	1	5	5			1	1		17
Slægt	Merismopedia		4							1	1	6
Slægt	Aphanothece	5		4								9
Slægt	Anabaena			1								1
Slægt	Aphanocapsa	5		4	5							14
Slægt	Synechococcus	5		4								9
Slægt	Chrysosporum			5								5
Slægt	Synechocystis				5							5
Slægt	Anabaenopsis				1							1

Klassifik	ation	B1	B2	B 3	BI	11	12	13	M1	M2	M3	Sum
Slægt	Dolichospermum	5			2				2	1		10
Slægt	Pseudoanabaena	5										5
Slægt	Planktolyngbya	5										5
Slægt	Snowella	5										5
Slægt	Microcystis	5										5
Slægt	Nostocales										2	2
Slægt	Geitlerinema								1	1		2
Slægt	Rhabdoglocea								1			1
Række	Xanthophyceae											
Slægt	Goniochloris	5	5	4	4		1	5				24
Slægt	Tetradriella				4							4
Række	Euglenophyceae											
Slægt	Euglena	5	5		5		5		1	3	1	25
Slægt	Lepocinclis	5	1		5			1				12
Slægt	Trachelomonas	5	5	5	5		5	5	1	4		35
Slægt	Phacus	5		5	5		3	5	1	1		25
Slægt	Strombomonas	5			1		3	2				11
Slægt	Colacium			1								1
Række	Conjugatophyceae											
Slægt	Closterium	5	5	5	5	5		5			2	32
Slægt	Cosmarium	5		4				1	1	2	2	15
Slægt	Staurastrum	4		3	5			2				14
Slægt	Teilingia			4								4
Slægt	Mougeotia	1		2	1					2		6
Slægt	Staurodesmus	5										5
Række	Cryptophyceae											
Orden	Cryptomonadales	1					1					2
Slægt	Cryptomonas	5		5	5	5	5	5	5	5	5	45

Klassifika	tion	B1	B2	B3	BI	11	12	13	M1	M2	M3	Sum
Slægt	Rhodomonas	5		1	4		5	5				20
Slægt	Katablepharis							2				2
Række	Bacillariophyceae											
Slægt	Nitzschia	5	5		5		5	5	2	3		30
Slægt	Navicula		5			1	5	1	5			17
Slægt	Achnanthes			1								1
Orden	Bacillariales	5		2				5	5	1		18
Slægt	Cocconeis								3	5		8
Række	Fragilariophyceae											
Slægt	Fragilaria			1			5		3			9
Slægt	Synedra ulna/acus				3							3
Slægt	Asterionella	5										5
Slægt	Licmophora								4	3		7
Slægt	Diatoma									4		4
Række	Chrysophyceae											
Slægt	Chromulina		5			3		5				13
Slægt	Kephyrion				1							1
Slægt	Dinobryon	3										3
Slægt	Uroglena									4		4
Række	Coscinodiscopheceae											
Orden	Biddulphiales	5		4	5		5	5	3	5		32
Slægt	Melosira			1	3		1		2	1		8
Slægt	Stephanodiscus			1								1
Række	Dinophyceae											
Gruppe	Athekate furealger	5					2	5	1			13
Gruppe	Thekate furealger	5			5		2	5	1	5		23
Slægt	Peridinium				2					1		3
Klassifika	ition	B1	B2	B 3	BI	11	12	13	M1	M2	M3	Sum

Række	Coccolithophyceae											
Slægt	Chrysochromulina		1					3				4
Række	Eustigmatophyceae											
Slægt	Pseudostaurastrum				2		2					4
Række	Synurophyceae											
Slægt	Mallomonas						5		1			6
Række	Klebsormidiophyceae											
Slægt	Elakatothrix	5						2				7
Række	Nephroselmidophyceae											
Slægt	Nephroselmis							1				1
Række	Ulvophyceae											
Slægt	Rhizoclonium								1			1
Gruppe	Flagellat											
Gruppe	Uidentificeret flagellat				5	3	3	5	1			17
	Sum	267	86	151	173	30	85	165	50	68	22	
	Antal taxa fundet i en eller flere prø- vetagningssteder i en sø	59	23	47	46	9	27	45	24	26	10	





Sammenligning af de 5 prøvetagningssteder i en sø

Grupperes taxa i rækker, blev de 5 prøvetagningssteder som oftest set at være ret ens, såvel set som antal organismer som biovolumen (Figur 57 og Figur 58). M1.3 skiller sig ud med et højt antal af *Euglenophyta* forårsaget af et højt antal (19% af det relative antal) af slægten *Euglena*. Herudover var de 5 prøvetagningssteder ved M2 noget mere heterogene end resten, blandt andet på grund af slægterne *Euglena* (række *Eugleonphyta*), *Dolichospermum* (række *Cyanophyta*) og *Uroglena* (række *Chrysophyta*) i M2.3 (der udgør henholdsvis 20%, 5% og 2.2% af det relative antal) samt *Cocconeis* (række *Bacillariophyta*) i M2.4 (3% af det relative antal).

For mere præcist at undersøge graden af similaritet mellem prøvetagningssteder i en regnvandssø, blev fytoplankton dataerne sammenlignet med Bray-Curtis similaritetsindeks, hvor 0 betyder ingen similaritet og 1 betyder fuldstændig similaritet. Baseredes sammenligningen på antal af individer, varierede indekset mellem 0,4224 og 0,9997 og tydede generelt på en høj grad af similaritet mellem de 5 prøvetagningssteder (Tabel 19). De laveste similaritetsindeks blev fundet for M1 og M2. Bestemmes similaritet i stedet på biovolumener, fås et tilsvarende billede af høj grad af similaritet. Igen er det M1 og M2, der har de laveste indeks for similaritet.

For prøvetagningssted M1.3 betyder forekomsten af *Euglena* (række *Euglenophyta*) og *Volvox* (række *Chlorophyta*), som er to store organismer, at det relative antal udgør henholdsvis 19% og 2.2% (samlet 21,2%), hvorimod det relative volumen i begge tilfælde dækker 31% (samlet 62%). Det samme gør sig gældende for M2, hvor det relative antal af gruppen thekate furealger (række *Dinophyta*) udgør henholdsvis 7, 27 og 19% af prøvetagningsstederne M2.1, M2.3 og M2.4, hvorimod det tilsvarende volumen udgør 50, 71 og 67%. Disse forskelle kommer også til udtryk, når Bray-Curtis similaritetsindekset bestemmes for prøvetagningsstederne (Tabel 19).

Sammenlignes dominans af taxa opgjort som antal individer versus biovolumener ses, at slægterne *Synechocystis* (i M1) og ordenen *Chroococcales* (i B1 og B3) under rækken *Cyanophyta* dominerer i antal i disse søer ved gennemsnitlig at udgøre 90% (B1), 94% (B3) og 98% (M1) af det relative antal (Figur 57), men de kun udgør 1% (B3), 3% (B1) og 27% (M1) af det relative volumen (Figur 58). Grundet at *Euglena* (række *Euglenophyta*) er en stor organisme, skal der derfor ikke mange individer til, før *Euglena* udgør en markant andel af prøvens fytoplanktonvolumen (se B1 og M1 i Figur 58).

	Bray-Curtis på	antal individer	Bray-Curtis p	å biovolumen
	Mindste indeks	Største indeks	Mindste indeks	Største indeks
B1	0,8505	0,9990	0,7064	0,8969
B2	0,9981	0,9997	0,8804	0,9959
B3	0,9437	0,9916	0,9050	0,9933
BI	0,9647	0,9959	0,6775	0,9084
11	0,9671	0,9984	0,9547	0,9995
12	0,7701	0,9564	0,7202	0,9079
13	0,6267	0,9205	0,7835	0,9496
M1	0,5267	0,9143	0,1926	0,9966
M2	0,4224	0,8459	0,0499	0,7805
M3	0,9099	0,9984	0,8278	0,9884

Tabel 19 Bray-Curtis similaritetsindeks for sammenligning mellem de 5 prøvetagningssteder i de 10 søer



Figur 57 Relativ fordeling af antal individer opgjort i fytoplankton rækker i de 10 regnvandssøer



Figur 58 Relativ fordeling af biovolumen opgjort i fytoplankton rækker i de 10 regnvandssøer

På grund af den høje grad af similaritet mellem prøvetagningsstederne blev det valgt at betragte alle 5 prøver per sø under ét (Figur 59).





Sammenligning af regnvandssøerne

ANOSIM test viste, at similaritet af antal individer grupperet i rækker mellem regnvandsøerne var lille (globalt R=0,615). Den mindste grad af similaritet blev fundet mellem motorvejssøerne (M1, M2, M3) versus søerne med industrioplande (I1, I2, I3), nemlig R=0,137 (p=0,017). For kombinationen motorvejssøer versus søer med beboelsesoplande (B1, B2, B3) var R=0,802 (p=0,001) og for kombinationen søer med beboelsesoplande versus søerne med industrioplande var R=0,811 (p=0,001). For biovolumen var de tilsvarende tal: Globalt R=0,437; kombinationen (M1, M2, M3) versus (I1, I2, I3): R=0,512 (p=0,001); Kombinationen (M1, M2, M3) versus (B1, B2, B3): R=0,704 (p=0,001): Kombinationen (B1, B2, B3) versus (I1, I2, I3): R=0,112 (p=0,031). Mens der altså var størst similaritet bestemt på baggrund af antal individer for kombinationen motorvejssøer versus søer med industrioplande, var den størst similaritet bestemt på baggrund af biovolumen for kombinationen søer med beboelsesoplande versus søer med industrioplande.

Figur 60 viseren klassisk Bray-Curtis cluster-analyse baseret på den log-tranformerede relative hyppighed af de identificerede fytoplanktonrækker mens Figur 61 viser den tilsvarende analyse med hensyn til fytoplanktonrækkernes biovolumen. Analysen viser ikke nogen tydelig gruppering i forhold til de forskellige oplandstyper, som bidrager med vand til søerne. Med hensyn til individantal udviste to af søerne med beboelsesoplande (B3 og B1) en ret høj similaritet, mens B2 grupperede sig langt herfra (Figur 60). I forhold til biovolumen (Figur 61) grupperede B2 sig derimod med B3, mens B1 grupperede sig lang fra disse to søer.



Figur 60 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplankton sammensætning af de undersøgte regnvandssøer. Analysen er baseret på det log-tranformerede relative antal individer grupperet i rækker



Figur 61 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplankton sammensætning af de undersøgte regnvandssøer. Analysen er baseret på det log-tranformerede relative biovolumen grupperet i rækker

Alt i alt synes der ikke at være nogen klar systematik i fytoplanktonsamfundenes similaritet i forhold til deres oplandstyper. På tilsvarende vis var der ingen tydelig indikation af, at søerne grupperede sig efter deres geografiske placering (Figur 1).

Påvirkninger

For at undersøge om der kan ses en trend mellem fytoplanktonsamfundenes sammensætning i regnvandssøer og forskellige målte kemiske og fysiske parametre, er der udført en DCAanalyse af den relative hyppighed af de fundne individer i de 10 søer. Analysen er udført såvel på antal af individer (Figur 62) som disses biovolumen (Figur 63).

For DCA på artsantal havde akse 1 en eigenværdi på 0,613 mens akse 2 havde en eigenværdi på 0,168. Yderligere akser havde eigenværdier under 0,1. Første akse havde derfor en væsentlig større forklaringsværdi end de andre akser. For DCA på biovolumen var forklaringsværdien ringe. Akse 1 havde en eigenværdi på 0,244 mens akse 2 havde en eigenværdi på 0,078.



Figur 62 DCA-analyse for fytoplanktonsammensætning af de undersøgte regnvandssøer. Analysen er baseret på det relative antal individer grupperet i rækker



Figur 63 DCA-analyse for fytoplanktonsammensætning af de undersøgte regnvandssøer. Analysen er baseret på det relative biovolumen grupperet i rækker

For DCA på artsantal (Figur 62) korrelerede akse 1 kun svagt med de målte biocidkoncentrationer. Korrelationerne rangerede fra R=-0,285 for dichlorooctylisothiazolinone til R=0,600 for mecoprop. Korrelationerne for akse 2 var endnu ringere. For DCA på biovolumen (Figur 63) korrelerede akse 1 ikke nævneværdigt med biocidkoncentrationer, rangerende fra R=-0,406 for tebuconazole til R=0,321 for diuron. Alt i alt tyder datasættet derfor på, at de undersøgte søers fytoplanktonsamfund grupperet på rækkeniveau ikke var relateret til biocidniveauerne målt i søerne. Den observerede forskel søerne imellem må derfor tilskrives andre forhold af betydning for disse samfund, for eksempel variationer i næringsstoffer, andre forurenende stoffer end biocider, lysforhold, hydrauliske forhold, vandudskiftning, saltindhold, bredvegetation, og så videre.

3.5 Mikro- og mesokosmosundersøgelser

Fytoplanktonsamfunds respons på biocidbelastning blev undersøgt i dosis-respons forsøg i mikrokosmos- og mesokosmosforsøg. Mikrokosmosforsøgene blev dels udført med vandfase alene (afsnit 2.6.1), og dels med en kombination af vandfase og sediment (afsnit 2.6.2). Meso-kosmosforsøgene blev udført i regnvandssø B1 ved at isolere en vandfase/sediment søjle i selve søen (afsnit 2.6.3). Fire biocider blev doseret til kosmerne (terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim. Mikrokosmosforsøgene løb over 10 dage, mens mesokosmosforsøget løb over 15 dage. Effekten af forskellige biocidkoncentrationer på fytoplanktonsamfundene blev undersøgt ved at sammenligne den taxonomiske sammensætning og hyppighed af fytoplanktontaxa. Alle forsøg blev gennemført med naturligt søvand uden tilsætning af næringssalte. Der har derfor været varierende grad af næringssaltbegrænsning i de forskellige forsøgstyper, såvel som muligvis i de enkelte kosmer.

3.5.1 Mikrokosmer med vandfasen alene

Mikrokosmerne bestod af 1-L glasflasker fyldt med søvand og tilsat biocid til koncentrationer på 10, 100 og 1000 ng L⁻¹ af terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim, altså i alt 3x4 = 12 kosmer (afsnit 2.6.1). De enkelte kosmer er navngivet i forhold til den tilsatte biocidkoncentration. For eksempel betyder TB 100, at der har været tilsat 100 ng L⁻¹ terbutryn til mikrokosmet. Hertil kom 3 mikrokosmer tilsat en blanding af de 4 biocider til samme koncentrationer. Det vil sige, at for eksempel kosmet MIX 10 havde 10 ng L⁻¹ af både terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim. Sluttelig var der 3 blanke uden tilsætning af biocider. Biocid blev målt i søvandet før dette blev fyldt på mikrokosmerne, samt ved forsøget slut i de enkelte mikrokosmer (Tabel 20).

Fytoplanktontaxa blev bestemt ved forsøgets start (dag 0), samt i mikrokosmerne ved forsøgets afslutning (Tabel 21). Et "+" tal i en tabelcelle angiver, at der har været fund af individer af det respektive taxon i kosmet. Kun kvantitativt vigtige taxa er blevet talte (afsnit 2.4.2).

Der blev fundet 46 taxa i mikrokosmosforsøgene med vandfase alene, der kunne henføres til rækkerne *Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Xanthophyta, Dinophyta* og *Bacillariophyta. Chrysophyta* blev fundet dag 0 men ikke ved forsøgets afslutning. Af rækkerne fundet i kosmerne blev *Chlorophyta* fundet hyppigst, mens *Chrysophyta* samt *Xanthophyta* kun blev fundet i enkelte kosmer. Af de 46 taxa var 27 til stede i mere end halvdelen af de 18 kosmer, mens 19 blev fundet mere sporadisk.

Det talte antal individer samt deres biovolumen er angivet i absolutte tal i Figur 64 og i relative tal i Figur 65. Ved forsøgets afslutning lå antal individer per mL i intervallet 1,7 10^4 mL⁻¹ (Blank 3) til 9,5 10^4 mL⁻¹ (MIX 1000). Sidstnævnte kosmos skilte sig ud fra resten, der alle lå i intervallet fra 1,7 10^4 mL⁻¹ til 4,8 10^4 mL⁻¹. Årsagen til at MIX 1000 lå så højt i individantal var en kraftig stigning i antallet af enkeltcellede individer i ordenen *Chroococcales*. I alle kosmerne på nær MIX 1000 lå de i snit omkring 2,2 10^4 individer mL⁻¹, mens de lå på 8,1 10^4 individer mL⁻¹ i MIX 1000.

Tabel 20 Biocidkoncentrationer i mikrokosmer med vandfase alene. Prøverne "søvand" refererer til biocidkoncentrationer i søvandet før tilsætning af biocider. Alle andre prøver refererer til slutkoncentrationer efter 10 døgn.

	ТВ	IRG	DR	CD
Søvand	5,6	< LOD	< LOD	6,4
Blank 1	5,9	< LOD	< LOD	< LOD
Blank 2	5,5	< LOD	< LOD	< LOD
Blank 3	7	< LOD	< LOD	< LOD
TB 10	11,2	< LOD	< LOD	8,6
TB 100	67	< LOD	< LOD	< LOD
TB 1000	816	< LOD	< LOD	< LOD
IRG 10	11,9	< LOD	< LOD	3,5
IRG 100	< LOD	37	< LOD	< LOD
IRG 1000	< LOD	513	< LOD	< LOD
DR 10	5,3	< LOD	< LOD	3
DR 100*	-	-	-	-
DR 1000	< LOD	< LOD	748	< LOD
CD 10	6,3	< LOD	< LOD	< LOD
CD 100	< LOD	< LOD	< LOD	83
CD 1000	< LOD	< LOD	< LOD	807
MIX 10	11,1	3,2	< LOD	9,4
MIX 100	69	86	< LOD	80
MIX 1000	861	486	721	789

* Prøven for DR 100 bortkom og kunne derfor ikke analyseres.

Klassifikation		Dag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	MIX 10	MIX 100	MIX 1000
Række	Chlorophyta (Grøn alge)																			
Orden	Sphaeropleales																			
Slægt	Ankistrodesmus			+						+							+	+		
Slægt	Coelastrum	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+		+
Slægt	Crucigenia	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Slægt	Monoraphidium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Pediastrum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Scenedesmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Tetraedron	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Tetrastrum	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Gruppe	Uidentificeret encellet	+		+	+			+										+	+	+
Orden	Volvocales																			
Slægt	Gonium	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	
Gruppe	Uidentificeret encellet	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Orden	Chlorococcales																			
Slægt	Treubaria		+	+	+		+	+				+	+			+		+		
Orden	Chlorelalles																			
Slægt	Actinastrum	+		+	+	+					+				+		+	+		+
Slægt	Chlorella		+	+			+	+												
Slægt	Dictyosphaerium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Didymocystis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Lagerheimia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Oocystis	+	+																	
Orden	Ulotrichales																			
Slægt	Elakatothrix	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Slægt	Koliella	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabel 21 Fytoplanktontaxa i mikrokosmer med vandfase alene. Taxa er identificeret ved forsøgets start (dag 0) og ved dets afslutning efter 10 dage. Et "+" tal i en tabelcelle angiver, at der har været fund af individer af det respektive taxon i kosmet.

Klassifi	kation	Dag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	MIX 10	MIX 100	MIX 1000
Orden	Zygnematales																			
Slægt	Closterium	+	+															+	+	
Slægt	Cosmarium			+																
Slægt	Staurastrum		+	+		+		+	+	+	+	+	+							
Række	Cyanophyta (Cyanobacteria,	blågrøn	alge)																	
Orden	Chroococcales																			
Slægt	Aphanocapsa		+	+		+	+		+		+				+	+	+	+		+
Slægt	Aphanothece		+	+	+		+			+					+					
Slægt	Snowella				+															
Gruppe	Snowella/Woronichinia					+							+							
Gruppe	Coccoidal cells	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe	Stavformede celler	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe	Uidentificeret koloni						+					+								
Orden	Nostocales																			
Slægt	Anabaena	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	
Slægt	Aphanizomenon		+																	
Orden	Oscillatoriales																			
Slægt	Pseudanabaena	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe	Uidentificeret	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Række	Euglenophyta																			
Slægt	Euglena	+			+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+
Slægt	Phacus			+				+												
Slægt	Trachelomonas	+							+			+								+
Slægt	Strombomonass	+	+		+	+				+	+	+	+	+	+		+			
Gruppe	Uidentificeret					+								+						
Række	Chrysophyta																			
Slægt	Dinobryon	+																		
Slægt	Chrysococcus	+																		
Række	Cryptophyta				-															

Klassifikation		Dag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	MIX 10	MIX 100	MIX 1000
Række	Cryptophyta	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
Række	Xanthophyta																			
Slægt	Centritractus																+		+	
Række	Dinophyta																			
Slægt	Peridinium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Række	Bacillariophyta																			
Group	Pennate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Group	Centric	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+
Group	Koloni- eller tråddannende	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Group	Uidentificeret																			
Group	Kolonidannende			+	+	+	+				+		+							
Summer kosmos	ing af antal fund i mikro-	Dag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	MIX 10	MIX 100	MIX 1000
	Total antal taxa i rækker	33	32	34	31	32	30	30	26	29	28	30	28	23	28	25	29	31	24	27
Række	Chlorophyta	18	18	20	17	16	16	18	13	16	15	16	15	12	15	13	16	19	13	15
Række	Cyanophyta	5	8	7	7	7	8	5	6	6	5	6	6	5	6	6	6	6	5	5
Række	Euglenophyta	3	1	1	2	3	0	2	2	2	2	3	2	2	2	1	1	1	1	2
Række	Chrysophyta	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Række	Cryptophyta	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Række	Xanthophyta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Række	Dinophyta	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Række Bacillariophyta

taxa i rækkerne

Heraf udgør antal uidentificeret

Med hensyn til MIX 1000, viste biovolumenerne (Figur 64) et noget andet billede end antal individer, idet MIX 1000 fremviste det laveste samlede volumen af alle kosmerne, nemlig 929 $10^3 \,\mu\text{m}^3 \,\text{mL}^{-1}$. Det største biovolumen blev fundet for Blank 2 med 1863 $10^3 \,\mu\text{m}^3 \,\text{mL}^{-1}$. Antal individer henholdsvis biovolumen korrelerede ikke entydigt med biocidkoncentrationer, men der var en vis tendens til, at blandingerne af de 4 biocider (MIX prøverne) førte til lavere biovolumen. Der kan ses andre tendenser i datasættet, for eksempel at antallet af *Chlorophyta* steg med stigende indhold af cybutryne (irgarol 1051) samt i et vist omfang med terbutryn og blanding af biocider. Med hensyn til rækkens biovolumen kunne der ikke ses samme tendens, med undtagelse af cybutryne (irgarol 1051), hvor biovolumen steg med stigende biocidkoncentration. Med andre ord, der blev generelt flere men mindre celler i denne række.



Figur 64 Fytoplankton opgjort på rækker ved slutning af mikrokosmosforsøg med vandfase alene. Øverst ses antal af organismer, nederst ses biovolumenet de udgør

Dinophyta blev i de fleste tilfælde fundet i større antal i de behandlede prøver (22-87 individer mL⁻¹) i forhold til de blanke (22-32 individer mL⁻¹). Ses på det relative volumen (Figur 65), tyder datasættet på, at terbutryn og diuron førte til en reduktion i volumenet af *Dinophyta*, hvilket også blev understøttet af, at MIX prøverne så en kraftig reduktion af *Dinophyta* med stigende
koncentration. *Euglenophyta* blev ikke fundet i de blanke kosmer i kvantificerbart omfang, men blev observeret i de behandlede prøver bortset fra CD 100, CD 1000, IRG 10 og DR 1000. Et lignende billede blev set for *Cyanophyta*, hvor de fleste behandlede prøver havde flere individer end kontrollerne. Som for *Dinophyta*, faldt biovolumenet af *Cyanophyta* med stigende koncentration af terbutryn og diuron. *Bacillariophyta* blev fundet i sammenligneligt antal uafhængig af om der var tilsat biocider er eller ej. Der var en svag tendens til, at biovolumenet af behandlede prøver var mindre end de blanke. For kosmer med biocidblanding var der et tydeligt fald i biovolumen med stigende biocidkoncentration.



Figur 65 Fytoplankton opgjort på rækker ved slutning af mikrokosmosforsøg med vandfase alene. Øverst ses det relative antal af organismer, nederst ses deres relative biovolumen Det totale antal organismer samt deres biovolumen blev grupperet i forskellige behandlingsgrupper. Først med hensyn til biocidkoncentrationer, men uden hensyntagen til hvilket biocid, der var tale om (altså f.eks. gruppere CD 10, IRG 10, DR 10, TB 10, MIX 10 i én gruppe, så alle dem med "100" i en anden, dem med "1000" i en tredje og de blanke i en fjerde). Derpå blev de grupperet efter biocid uden at se på den koncentration, de fandtes i (altså gruppere alle blank, CD, IRG, TB, DR og MIX). One-way ANOVA på de log-tranformerede data (SigmaPlot 12.3) blev brugt til at teste, om der var signifikant forskel på grupperne. Der blev ikke fundet nogen forskel på grupperne, hverken med hensyn til det totale antal individer eller med hensyn til deres biovolumen.

Alle prøver blev desuden testet ved Bray-Curtis similaritetsanalyse (Past v. 3, afsnit 2.5.3). Analysen viste, at MIX 1000 kosmerne var mest forskellig fra de 3 kontrolprøverne med similaritetsindeks på 0,31 - 0,47 for antal individer. For biovolumener var similaritetsindekset 0,49 - 0,62. Når kontrolprøve 3 blev undladt var indekset 0,49 - 0,50. Similaritetsindekset i forhold til alle 3 kontrolprøver rangerede for alle andre prøver i intervallet 0,53 - 0,96 for antal individer og 0,58 - 0,96 for biovolumener.

3.5.2 Mikrokosmer med sediment og vandfase

Mikrokosmerne bestod af sedimentrør konstrueret i glas, hvor søsediment var overlejret af en vandfase (afsnit 2.6.2). Der var tilsat biocid til koncentrationer på 10, 100 og 1000 ng L⁻¹ af terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim, altså i alt 3x4 = 12 kosmer. Som for mikrokosmer med vandfase alene, er de enkelte kosmer navngivet i forhold til den tilsatte biocidkoncentration. For eksempel betyder TB 100, at der har været tilsat 100 ng L⁻¹ terbutryn til mikrokosmet. Hertil kom 3 mikrokosmet tilsat en blanding af de 4 biocider til samme koncentrationer. Det vil sige, at for eksempel kosmet MIX 10 havde 10 ng L⁻¹ af både terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim. Sluttelig var der 3 blanke uden tilsætning af biocider. Biocid blev målt i søvandet før dette blev fyldt på mikrokosmerne, samt ved forsøgets slut i de enkelte mikrokosmer (Tabel 22).

	ТВ	IRG	DR	CD
Søvand 1	7	< LOD	< LOD	7,2
Blank 1	8,4	< LOD	< LOD	12
Blank 2	8,7	< LOD	< LOD	8,7
Blank 3	8,5	< LOD	< LOD	13
TB 10	9,6	< LOD	< LOD	7,3
TB 100	-	-	-	-
TB 1000	-	-	-	-
IRG 10	7,4	< LOD	< LOD	< LOD
IRG 100	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
IRG 1000	< LOD	106	< LOD	< LOD
DR 10	-	-	-	-
DR 100	-	-	-	-
DR 1000	-	-	-	-
CD 10	6,3	< LOD	< LOD	11,2
CD 100	< LOD	< LOD	< LOD	67
CD 1000	< LOD	< LOD	< LOD	639
MIX 10	14,6	3,8	< LOD	11,1
MIX 100	< LOD	< LOD	< LOD	67
MIX 1000	333	205	< LOD	554

Tabel 22 Biocidkoncentrationer i mikrokosmer med sediment og vandfase. Prøverne "søvand" refererer til biocidkoncentrationer i søvandet før tilsætning af biocider. Alle andre prøver refererer til slutkoncentrationer efter 10 døgn.

Fytoplanktontaxa blev bestemt ved forsøgets start (dag 0), samt i mikrokosmerne ved forsøgets afslutning (Tabel 23). Et "+" tal i en tabelcelle angiver, at der har været fund af individer af det respektive taxon i kosmet. Kun kvantitativt vigtige taxa er blevet talte (afsnit 2.4.2).

Der blev fundet 52 taxa, der kunne henføres til de samme rækker som for mikrokosmer med vandfase alene (afsnit 3.5.1), på nær *Chrysophyta*, der alene blev fundet dag 0 (*Dinobryon*) men ikke ved forsøgets slut. Der blev altså fundet taxa i rækkerne *Chlorophyta*, *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, *Cryptophyta*, *Xanthophyta*, *Dinophyta* og *Bacillariophyta*. Også her blev *Chlorophyta* fundet hyppigst, mens *Xanthophyta* kun blev fundet i enkelte kosmer. Af de 51 taxa der var til stede ved forsøgets slut, var de 23 til stede i mere end halvdelen af de 18 kosmer, mens de 28 blev fundet mere sporadisk.

Det talte antal individer samt deres biovolumen er angivet i absolutte tal i Figur 66 og i relative tal i Figur 67. Ved forsøgets afslutning lå antal individer per mL i intervallet $3,5 \ 10^3 \ mL^{-1}$ (DR 10) til $1,3 \ 10^5 \ mL^{-1}$ (IRG 1000). Langt hovedparten af sidstnævnte fandtes i rækken *Chlorophyta*. Heraf udgjorde to slægter, *Monoraphidium* og *Chlorella*, de 98% (hhv. 69% og 29%). Tilsammen udgjorde disse slægter 91% (62 – 99,6%) af alle individer i kosmerne. I alle kosmer var *Monoraphidium* til stede i væsentligt antal, mens *Chlorella* var til stede i stort antal i 7 af kosmerne. Der var i denne sammenhæng ingen systematik i forhold til biocidkoncentrationerne, for eksempel var *Chlorella* til stede med 58% af det samlede individantal i Blank 1, men i ikke-kvantificerbart antal i Blank 2 og 3. Det laveste antal blev fundet for TB 1000, tæt fulgt af DR 10 og derpå IRG 10. Alt i alt var der ikke korrelation mellem det totale antal organismer og den tilsatte biocidkoncentration.

I forhold til biovolumen steg det samlede talte antal med stigende koncentrationer af diuron, carbendazim og cybutryne (irgarol 1051), mens det faldt med stigende koncentration af terbutryn. For blandingen af de 4 biocider var der ingen klar tendens.

Som for mikrokosmer med vandfase alene, blev one-way ANOVA på de log-tranformerede data (SigmaPlot 12.3) brugt til at teste, om der var signifikant forskel på kosmerne. Der blev ikke fundet nogen forskel på kosmerne, hverken med hensyn til det totale antal individer eller med hensyn til deres biovolumen.

Klassifikation Dag Blank Blank Blank CD CD CD IRG IRG IRG TB TB TB DR DR DR MIX MIX MIX 2 10 0 1 3 100 1000 10 100 1000 10 100 1000 10 100 1000 10 100 1000 Række Chlorophyta (Grøn alge) Orden Sphaeropleales Slægt Ankistrodesmus + Slægt Coelastrum + + Slægt Crucigenia + + + + + + + + + + + + + + + + + + Monoraphidium + + + + + + + + Slægt + ++ + + ++ ++ + + Pediastrum + + Slægt + ++ + ++ + + Scenedesmus Slægt + + + + + + + + + + + + + + + + + + + Slægt Tetraedron + + + + + + + + + + + + + + + + + + + Slægt Tetrastrum + + + + + + + + + + + + + + + + + + Gruppe Uidentificeret enkeltcelle + + + + + + + + + + + + + + + + + + Gruppe Uidentificeret koloni + +Orden Volvocales Slægt Gonium + + + Uidentificeret enkeltcellet + Gruppe + + + + + + + Orden Chlorococcales Slægt Desmatractum + + + + + + + + + + + + + Slægt Quadricoccus +Slægt Treubaria + + + + + + + + + + + + + + Orden Chlorelalles Slægt Actinastrum + + + + + + + + + Slægt Chlorella + + + + + + + + + + + + + + + + + + + Crucigeniella + Slægt + + Dictyosphaerium + + + + + + + + + Slægt + + + + + + Didymocystis + + + + + + + + + + + + + + + + + + + Slægt Slægt Lagerheimia + + + + + + + + + + + + + + + + + +

Tabel 23 Fytoplanktontaxa i mikrokosmer med sediment og vandfase. Taxa er identificeret ved forsøgets start (dag 0) og ved dets afslutning efter 10 dage. Et "+" tal i en tabelcelle angiver, at der har været fund af individer af det respektive taxon i kosmet.

Klassifil	kation	Dag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	MIX 10	MIX 100	MIX 1000
Slægt	Nephrocytium																+		+	
Slægt	Oocystis				+														+	
Orden	Ulotrichales																			
Slægt	Elakatothrix	+	+																	
Slægt	Koliella	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
Orden	Zygnematales																			
Slægt	Closterium		+							+								+	+	
Slægt	Cosmarium						+													
Række	Cyanophyta (Cyanobacteria,	blågrøn	alge)																	
Orden	Chroococcales																			
Slægt	Aphanocapsa		+									+								
Slægt	Chroococcus																		+	
Slægt	Microcystis																		+	
Slægt	Snowella		+																	
Gruppe	Snowella/Woronichinia										+	+							+	
Gruppe	Coccoidal celler	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Gruppe	Stavformet celle	+		+	+	+		+					+		+	+				+
Gruppe	Uidentificeret koloni		+		+			+		+	+						+	+	+	
Orden	Nostocales																			
Slægt	Anabaena	+	+										+				+	+	+	
Orden	Oscillatoriales																			
Slægt	Pseudanabaena	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
Gruppe	Uidentificeret	+	+	+		+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Række	Euglenophyta																			
Slægt	Euglena	+	+		+	+	+	+				+				+				
Slægt	Lepocinclis				+															
Slægt	Phacus		+		+		+											+		
Slægt	Trachelomonas		+		+								+			+		+	+	
Slægt	Strombomonass	+	+		+	+	+								+		+	+		

Klassifikation	D	ag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	МІХ 10	MIX 100	MIX 1000
Gruppe Uidentificeret					+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+
Række Chrysophyta																				
Slægt Dinobryon		+																		
Række Cryptophyta																				
Række Cryptophyta		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Række Xanthophyta																				
Slægt Centritractus			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Slægt Goniochloris			+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	+	+	+	+	+
Slægt Peridinium		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+
Række Bacillariophyta																				
Gruppe Pennate		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe Centric		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+
Gruppe Koloni- eller trå	ddannende	+										+					+	+		
Summering af antal fun kosmos	d i mikro- D	ag 0	Blank 1	Blank 2	Blank 3	CD 10	CD 100	CD 1000	IRG 10	IRG 100	IRG 1000	ТВ 10	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	DR 1000	MIX 10	MIX 100	MIX 1000
Total antal taxa i rækker	2	28	35	23	29	26	30	28	23	22	26	28	29	17	21	22	30	31	34	23
Række Chlorophyta	1	15	18	14	14	13	18	15	15	13	15	15	16	12	10	11	16	16	19	13
Række Cyanophyta	:	5	7	4	4	4	2	5	2	3	5	5	5	2	4	3	5	5	8	3
Række Euglenophyta	:	2	4	0	6	3	4	2	1	1	0	1	2	1	2	3	2	4	2	1
Række Chrysophyta		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Række Cryptophyta		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Række Xanthophyta		0	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
Række Dinophyta		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
Række Bacillariophyt	a :	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	1	1	1	3	3	2	2
Heraf udgør antal uiden taxa i rækkerne	lificeret	2	2	2	3	3	2	4	1	2	2	2	3	2	3	2	4	3	4	2

Sammenlignes individantal og biovolumen på række-niveau ses, at antal og biovolumen af *Chlorophyta* steg med stigende koncentrationer af cybutryne (irgarol 1051), mens der blev set et fald med stigende koncentration af terbutryn. For carbendazim, diuron og blandinger af biocider var der ingen sådan tendens. Det relative antal steg med stigende terbutryn koncentration, mens der ingen tydelige tendenser var for det relative biovolumen.

For *Cyanophyta* steg antal individer og biovolumen med stigende koncentration af carbendazim og cybutryne (irgarol 1051). Endvidere blev der set stigning med stigende koncentration af diuron. For TB 1000 og MIX 1000 var rækken ikke til stede over kvantifikationsgrænsen. For *Cyanophyta* blev billedet noget sløret af opblomstring af enkeltcellede *Chroococcales* i kosmerne Blank 1, TB 10, MIX 10 og MIX 100, hvor denne slægt kom til at udgøre 80 – 99% af alle individer.

Euglenophyta blev fundet i væsentligt højere koncentrationer i Blank 1 og 3 i forhold til alle prøver behandlet med biocider. Der blev ikke fundet *Euglenophyta* i Blank 2. Der var ingen klare tendenser til stigning eller fald i antal individer og biovolumen med varierende biocidkoncentrationer for denne række. Det relative individantal og volumen af rækken faldt med stigende koncentration af carbendazim, cybutryne (irgarol 1051) samt biocidmixet, mens der ikke kunne blev set tilsvarende tendenser for terbutryn og diuron.

For *Cryptophyta* blev der ikke set klare tendenser. Selvom denne række ikke var til stede i MIX 1000 i kvantificeret omfang, gjorde det samme sig gældende for Blank 3. I øvrigt var der sammenlignelig variation mellem de tre blanke kosmer for denne slægt, som der var mellem de behandlede kosmer.

Dinophyta var ikke til stede i kvantificeret omfang i de 3 blanke prøver, og kun sporadisk til stede i de behandlede prøver, uden at der kunne ses nogen systematik i forhold til de tilsatte biocidkoncentrationer.

Antallet af *Bacillariophyta* lå for 16 af de 18 kosmer i intervallet 200 - 1000 mL⁻¹ på nær for Blank 1 og MIX 1000, hvor antallet lå på cirka 3000 mL⁻¹. I kosmet Blank 1 udgjorde denne række således knap 6% af det samlede individantal, mens det for MIX 1000 udgjorde godt 19%. I forhold til biovolumen udgjorde *Bacillariophyta* i de to kosmer henholdsvis knap 16% og godt 50%

Alle prøver blev desuden testet ved Bray-Curtis similaritetsanalyse (Past v. 3, afsnit 2.5.3). Analysen viste, at Blank 3 var ret forskellig fra Blank 1 og 2 med et similaritetsindeks på henholdsvis 0,29 og 0,30. Generelt var similaritetsindeksene lave, og kosmerne derfor ret forskellige fra hinanden, og analysen viste ikke nogen tydelig tendenser i forhold til biocidkoncentrationer.



Figur 66 Fytoplankton opgjort på rækker ved slutning af mikrokosmosforsøg med sediment og vandfase. Øverst ses antal af organismer, nederst ses det biovolumen som de udgør



Figur 67 Fytoplankton opgjort på rækker ved slutning af mikrokosmosforsøg med sediment og vandfase. Øverst ses det relative antal af organismer, nederst ses det relative biovolumen som de udgør

3.5.3 Mesokosmer i en regnvandssø

Ti mesokosmer blev placeret i regnvandssø B1 som beskrevet i afsnit 2.6.3. Efter at sedimentet og vandet i kosmerne havde haft nogle dage til at falde til ro, blev der doseret 100 ng L⁻¹ henholdsvis 1000 ng L⁻¹ af terbutryn, cybutryne (irgarol 1051), diuron og carbendazim. Som diskuteret i afsnit 3.2.3, var de faktiske biocidkoncentrationer i kolonnerne stærkt påvirket af dels en baggrundsbelastning af terbutryn og carbendazim på 20 – 30 ng L⁻¹ ved forsøgets start, og dels af, at sedimentet frigav ret store mængder af carbendazim undervejs i forsøgene. Eksponeringerne for biocider var derfor en del anderledes end planlagt. Alle kosmerne har været påvirket af carbendazim mellem cirka 100 og 1000 ng L⁻¹, samt af mindst 20-40 ng L⁻¹ terbutryn, et forhold der skal tages i betragtning ved fortolkning af fytoplanktondata. Tabel 24 giver et overblik over hvilket niveau af biocider, der blev målt i kosmerne. De markerede felter angiver hvor der burde have været maksimalt 100 ng L⁻¹ (lyse felter) henholdsvis maksimalt 1000 ng L⁻¹ (mørke felter).

	Målt TE	3 [ng L ⁻¹]	Målt IR	G [ng L ⁻¹]	Målt DF	R [ng L ⁻¹]	Målt Cl	D [ng L ⁻¹]
	Max	Middel	Max	Middel	Max	Middel	Max	Middel
Blank 1	38	26					759	477
Blank 2	45	37					154	94
TB 100	153	83					322	208
TB 1000	1187	897					602	239
IRG 100	57	43	98	27			109	88
IRG 1000	52	41	1080	481			833	428
DR 100	46	36			-	-	295	143
DR 1000	38	31			1041	628	253	113
CD 100	48	27					533	275
CD 1000	38	32					963	622

Tabel 24 Maksimale og middelværdier af biocider i mesokosmer

* Detektionsgrænsen for DR tillod i denne måleserie ikke målinger under 100 ng L⁻¹ diuron

Ud over biocider blev der målt pH, ilt, ledningsevne og temperatur (Figur 68). pH faldt i søen såvel som i alle mesokosmerne med en nogenlunde ensartet tendens. De to målinger i søen er taget på hver sin søbred, og der blev set væsentlig forskel i pH på trods af søens lidenhed. Ilt faldt i begyndelsen af forsøgene og steg igen svagt de sidste dage. Iltindholdet i mesokosmerne var tydeligt lavere end i selve søen, formentlig på grund af en ringe geniltning forårsaget af mindre vindinduceret omrøring. Ledningsevnen i søen steg den første uge, for derpå igen at falde drastisk. Faldet var formentlig forårsaget af en stor regnhændelse den 22. juni (dag 7). Herefter steg ledningsevnen i søen igen. I de fleste mesokosmer steg ledningsevnen over tid, på nær 3 kosmer, hvor den faldt sidst i forsøget. Variationerne i ledningsevne var alt i alt moderate. Vandtemperature lå på 17,5 – 20°C, med minimum omkring dag 6.

Fytoplanktontaxa blev bestemt i to prøver fra søen ved forsøgets start og slut efter 15 døgn (Sø 1 d0, Sø 2 dag 0, Sø 1 d15 og Sø 2 d15). I mikrokosmerne blev fytoplanktontaxa bestemt ved forsøgets afslutning (Tabel 25). Et "+" tal i en tabelcelle angiver, at der har været fund af individer af det respektive taxon i kosmet. Kun kvantitativt vigtige taxa er blevet talte (afsnit 2.4.2).

I mesokosmerne ved forsøgets slut blev der fundet 40 taxa, der kunne henføres til rækkerne *Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenophyta, Chrysophyta, Cryptophyta, Xanthophyta, Dinophyta* og *Bacillariophyta* (Tabel 25). Heraf blev *Chlorophyta* fundet hyppigst, mens *Chrysophyta* samt *Dinophyta* kun blev fundet i et enkelt kosmos. Af de 40 taxa var 23 til stede i mere end halvdelen af de 10 kosmer, mens 17 blev fundet mere sporadisk. I selve søen blev der samlet for dag 0 og 15 fundet 49 taxa.

Det talte antal individer samt deres biovolumen er angivet i absolutte tal i Figur 69 og i relative tal i Figur 70. Ved forsøgets slut lå antal individer per mL i mesokosmerne i intervallet 2,6 10^2 mL⁻¹ (TB 1000) til 4,1 10^5 mL⁻¹ (Blank 1 samt DR 1000). Her skal det bemærkes, at Blank 1 indeholdt næsten lige så meget carbendazim som CD 1000, og altså de facto ikke kan betragtes som en blank i forhold til biocidindhold (Tabel 24). Tre af kosmerne indeholdt et ganske stort antal individer i forhold til værdierne i søen, nemlig Blank 1, IRG 1000 og DR 1000. Andre kosmer havde ganske lave værdier, især CD 1000, TB 100 og TB 1000, der lå på eller under 3 10^2 mL⁻¹.

Som for mikrokosmosforsøgene, blev one-way ANOVA på de log-tranformerede data (Sigma-Plot 12.3) brugt til at teste, om der var signifikant forskel på kosmerne. Der blev ikke fundet nogen forskel kosmerne imellem, hverken med hensyn til det totale antal individer eller med hensyn til deres biovolumen.



Figur 68 Vandkvalitetsparametrene pH, ilt, ledningsevne og temperatur under mesokosmosforsøg i regnvandssø B1

Tabel 25 Fytoplanktontaxa i mesokosmer fra en regnvandssø. Taxa er identificeret ved forsøgets start (dag 0) og ved dets afslutning efter 15 dage. Et "+" tal i en tabelcelle angiver, at der har været fund af individer af det respektive taxon i kosmet.

Klassifil	kation	Sø 1 Dag 0	Sø 2 Dag 0	Blank 1	Blank 2	CD 100	CD 1000	IRG 100	IRG 1000	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	Sø 1 Dag 15	Sø 2 Dag 15
Række	Chlorophyta (Grønne alger)														
Orden	Sphaeropleales														
Slægt	Ankistrodesmus			+	+	+								+	+
Slægt	Coelastrum		+		+				+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Crucigenia			+			+		+	+		+	+	+	
Slægt	Kirchneriella			+											+
Slægt	Monoraphidium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Pediastrum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Scenedesmus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Tetraedron	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Tetrastrum	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+
Gruppe	Uidentificeret enkeltcellet			+	+	+			+		+	+	+		
Order	Volvocales														
Slægt	Gonium	+	+					+						+	+
Gruppe	Uidentificeret enkeltcellet	+						+					+	+	+
Orden	Chlorococcales														
Slægt	Desmatractum	+		+											
Orden	Chlorelalles														
Slægt	Actinastrum													+	
Slægt	Chlorella		+	+		+	+	+	+	+		+	+		+
Slægt	Crucigeniella	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Dictyosphaerium		+											+	+
Slægt	Didymocystis		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Lagerheimia	+	+	+				+	+					+	+
Slægt	Nephrocytium			+								+			+

Klessifi	ration	• •												• •	
NIdSSIII	Kation	Sø 1 Dag 0	Sø 2 Dag 0	Blank 1	Blank 2	100	1000	100	1000	100	1000	DR 10	100	Sø 1 Dag 15	Sø 2 Dag 15
Slægt	Oocystis												+		
Orden	Ulotrichales														
Slægt	Elakatothrix		+												
Slægt	Koliella	+	+	+	+							+		+	+
Orden	Zygnematales														
Slægt	Closterium	+	+	+	+	+	+	+		+				+	+
Slægt	Staurastrum													+	+
Række	Cyanophyta (Cyanobacteria	ı, blågrønr	e alger)												
Orden	Chroococcales														
Slægt	Chroococcus														+
Slægt	Merismopedia				+										
Slægt	Microcystis														+
Slægt	Snowella				+					+					
Gruppe	Snowella/Woronichinia					+			+						
Gruppe	Coccoidal celler	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe	Stavformede celler	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+
Gruppe	Uidentificeret koloni													+	
Orden	Nostocales														
Slægt	Anabaena		+												
Orden	Oscillatoriales														
Gruppe	Uidentificeret	+	+	+	+	+		+	+		+	+		+	+
Række	Euglenophyta														
Slægt	Euglena	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Lepocinclis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Slægt	Phacus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Trachelomonas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slægt	Strombomonass	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+

Klassifik	ation	Sø 1 Dag 0	Sø 2 Dag 0	Blank 1	Blank 2	CD 100	CD 1000	IRG 100	IRG 1000	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	Sø 1 Dag 15	Sø 2 Dag 15
Gruppe	Uidentificeret	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Række	Chrysophyta														
Slægt	Dinobryon							+						+	+
Række	Cryptophyta														
Række	Cryptophyta	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Række	Xanthophyta														
Slægt	Centritractus		+		+							+		+	+
Slægt	Goniochloris	+	+	+	+	+		+		+		+		+	+
Række	Dinophyta														
Slægt	Peridinium	+	+	+										+	+
Række	Bacillariophyta														
Gruppe	Pennate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe	Centric		+											+	+
Gruppe	Koloni- eller tråddannende							+		+				+	+
Summer kosmos	ing af antal fund i mikro-	Sø 1 Dag 0	Sø 2 Dag 0	Blank 1	Blank 2	CD 100	CD 1000	IRG 100	IRG 1000	ТВ 100	ТВ 1000	DR 10	DR 100	Sø 1 Dag 15	Sø 2 Dag 15
Total an	tal taxa i rækker	25	31	30	27	22	20	24	24	23	19	24	22	36	38
Række	Chlorophyta	12	15	17	12	10	10	10	12	11	9	13	13	18	19
Række	Cyanophyta	3	4	3	5	3	2	3	4	2	3	3	2	4	5
Række	Euglenophyta	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	4	5	6	6
Række	Chrysophyta	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Række	Cryptophyta	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Række	Xanthophyta	1	2	1	2	1	0	1	0	1	0	2	0	2	2
Række	Dinophyta	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Række	Bacillariophyta	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	3	3
Heraf ud taxa i ræ	lgør antal uidentificeret ekkerne	3	2	3	3	3	1	3	3	1	3	3	3	4	3



Figur 69 Fytoplankton opgjort på rækker ved slutning af mesokosmosforsøg placeret i en regnvandssø. Øverst ses antal af organismer, nederst ses det biovolumen som de udgør

Det laveste biovolumen blev fundet i TB 100 (141 10³ µm³ mL⁻¹) mens de højeste blev fundet i IRG 1000 (2367 10³ µm³ mL⁻¹). Biovolumenet i kosmerne var generelt lavere end i søen, på nær Sø 1 d15, hvor biovolumenet var på niveau med de højeste værdier i kosmerne. De høje værdier i søen i forhold til kosmerne kunne primært tilskrives forskellige slægter i rækken *Euglenophyta*, der udgjorde omkring 90% af biovolumenet i søen, på nær prøve Sø 1 d15, hvor rækken udgjorde 69%.

Ses på de forskellige rækker i mikrokosmerne fås, at *Chlorophyta* udgjorde > 80% af individantallet i CD 100, IRG 1000, DR 100 og DR 1000, men fandtes i lave relative individantal, < 10%, i Blank 2, IRG 100 og TB 1000. I IRG 1000 og DR 1000 udgjorde de endvidere hovedparten af biovolumenet (ca. 80%). I forhold til søen lå det relative individantal og biovolumen af *Chlorophyta* i mesokosmerne højt. I søen udgjorde denne række 0,5 – 1.5% af individantallet og < 1% af biovolumenet, på nær i Sø 2 d15, hvor de udgjorde 22%, hvilket delvist skyldtes en højere hyppighed af *Euglenophyta* i denne prøve. I absolutte tal lå antallet af *Chlorophyta* højest i IRG 1000 (5,8 10⁵ mL⁻¹), fulgt af DR 1000 (3,7 10⁵ mL⁻¹) og Blank 1 (1,5 10⁵ mL⁻¹). I de andre kosmer, såvel som i søen, lå antallet af individer 2 – 3 dekader lavere. *Cyanophyta*, der udgjorde > 85% af individantallet i selve søen, fandtes i et antal på > 60% i Blank 1, Blank 2 og IRG 100, men var ikke til stede i kvantificeret omfang i kosmerne CD 100, CD 1000, TB 100 og TB 1000. I IRG 1000 og DR 1000 udgjorde de < 10% af individantallet. *Cyanophyta* udgjorde generelt en beskeden del af biovolumenet i såvel kosmerne som selve søen (0 - 2,7%). Det største antal individer blev fundet i Blank 1 (2,6 10^5 mL^{-1}), i et antal der lå 1 - 2 dekader over de andre kosmer, hvor rækken blev fundet, såvel som selve søen.



Figur 70 Fytoplankton opgjort på rækker ved slutning af mesokosmosforsøg placeret i en regnvandssø. Øverst ses det relative antal af organismer, nederst ses det det relative biovolumen som de udgør

Euglenophyta dominerede i TB 1000 med 76% af det samlede antal individer. I CD 1000 var antallet 33% og i TB 100 var det 21%. I de andre kosmer udgjorde *Euglenophyta* < 1,4%. Denne række udgjorde hovedparten af den relative biomasse i alle kosmer samt i søen. I snit var 62% af biomassen *Euglenophyta*, rangerende fra 14% i IRG 1000 til 93% i TB 1000. I søen var det tilsvarende gennemsnit 86%. Antal individer i kosmerne lå relativt konstant i intervallet 55 – 493 mL⁻¹. Det tilsvarende biovolumen var 88 – 941 10³ µm³ mL⁻¹.

Cryptophyta fandtes i et ret konstant antal og biovolumen i alle kosmerne, henholdsvis 21 – 510 mL⁻¹ og 15 – 395 10³ µm³ mL⁻¹. Mest dominerende var rækken i Blank 1 og TB 100, hvor den udgjorde henholdsvis 20% og 19% af biovolumenet. I den første af disse, Blank 1, udgjorde den kun 0,12% af det samlede individantal, mens den udgjorde 23% i den anden, TB 100.

I ingen af mesokosmerne fandtes *Dinophyta* i et antal der blev kvantificeret. I søen ved forsøgets start fandtes denne slægt i et lavt antal (22 – 86 mL⁻¹), men fandtes ved forsøgets slut under kvantifikationsgrænsen. Omvendt var det med *Chrysophyta*, der alene fandtes over kvantifikationsgrænsen i søen ved forsøgets slut, og ikke i nogen af kosmerne. *Xanthophyta* forekom ikke i hverken søen eller kosmerne i koncentrationer over kvantifikationsgrænsen.

Bacillariophyta forekom i største hyppighed i TB 10 med 346 mL⁻¹ og under kvantifikationsgrænsen i DR 100. I de fleste andre kosmer lå antallet af *Bacillariophyta* på 2-cifrede antal per mL. På nær for TB 100 udgjorde rækken en ret stor procentdel af det samlede antal individer (31%), fulgt af CD 1000 (19%), TB 1000 (8%) og Blank 2 (3%). I resten af kosmerne udgjorde rækken omkring eller under 0,5%, tilsvarende for selve søen. I form af biovolumen udgjorde *Bacillariophyta* 8 – 10% i Blank 2, CD 1000 og TB 100, mens rækken udgjorde under et par procent i resten af kosmerne samt prøverne fra søen.

Alle prøver blev desuden testet ved Bray-Curtis similaritetsanalyse (Past v. 3, afsnit 2.5.3). Analysen viste stor variation i similaritetsindeks kosmerne imellem, med et gennemsnitligt indeks på 0,13. De største similaritetsindeks blev fundet mellem DR 1000 og IRG 1000 (0,77), CD 1000 og TB 100 (0,70), CD 1000 og TB 1000 (0,57), IRG 100 og Blank 2 (0,51). Alle andre par havde indeks under 0,5. Alt i alt tyder analysen ikke på nogen klare tendenser på similaritet mellem kosmerne og biocidkoncentrationer. Sammenlignes prøverne i søen med kosmerne, var der generelt høj dissimilaritet på nær for IRG 100 i forhold til alle søprøver (similaritetsindeks omkring 0,6). Indbyrdes viste søprøverne til dag 0 et similaritetsindeks på 0,93 og dag 15 på 0,91. Sammenlignes dag 0 og dag 15 var indekset 0,83 – 0,95. Fytoplanktonsammensætningen i søen ændrede sig altså kun lidt i forsøgsperioden set i forhold til, hvordan sammensætningen ændrede sig i mesokosmerne.

3.5.4 Størrelsesfordeling af individer i udvalgte taxa

For slægterne *Scenedesmus*, *Euglena* og *Trachelomonas*, gruppen af pennate diatoméer, samt rækken *Cryptophyta* blev organismerne kvantificeret i 2-4 størrelsesgrupper. I det følgende vurderes mulige sammenhæng mellem størrelsesfordelinger i kosmerne og biocidniveauet heri.

Slægten *Scenedesmus* og gruppen af pennate diatoméer blev set på i alle tre kosmos forsøg (afsnit 3.5.1, 0, 3.5.3), mens slægterne *Euglena* og *Trachelomonas* samt rækken *Cryptophyta* alene blev set på i mesokosmosforsøgene (afsnit 3.5.3).

Størrelsesfordeling af individer i slægten Scenedesmus

Scenedesmus blev talt i to størrelsesgrupper, 5 – 10 µm og 10 – 20 µm. For mikrokosmosforsøg med vandfase alene var medianværdien af de talte antal i de biocidbehandlede kosmer noget højere end i de ubehandlede kosmer for begge størrelsesgrupper. For mikrokosmosforsøget med vandfase og sediment samt mesokosmosforsøget forholdt det sig modsat.

For terbutryn blev der for alle tre kosmosforsøg set en tendens til, at organismerne blev mindre med stigende koncentration (Figur 71, Figur 72, Figur 73). I mikrokosmosforsøg med vandfase og sediment blev denne tendens også set for blandingen af biociderne (MIX 10 - 1000), mens der ikke blev set en sådan tendens for mikrokosmosforsøg med vandfase alene. For de andre biocider blev der ikke set tydelige tendenser til, at størrelsesfordelingen blev påvirket af biocid-indholdet.



Figur 71 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af slægten *Scenedesmus* i mikrokosmer med vandfase alene



Figur 72 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af slægten *Scenedesmus* i mikrokosmer med sediment og vandfase



Figur 73 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af slægten *Scenedesmus* i mesokosmer i sø B1

Størrelsesfordeling af individer i gruppen af pennate diatoméer

Pennate diatoméer blev i vandfaseforsøgene talt i størrelsesgrupperne $30 - 50 \ \mu m$, $50 - 100 \ \mu m$ og > 100 μm . Endvidere blev der talt koloni- eller filamentdannende diatoméer (Figur 74). I mikrokosmosforsøg med vandfase og sediment blev de talt i de samme størrelsesgrupper, men uden koloni- eller filamentdannende diatoméer, da disse her kun fandtes i ubetydeligt antal (Figur 75). I mesokosmosforsøgene blev pennate diatoméer talt i størrelsesgrupperne $20 - 30 \ \mu m$, $30 - 50 \ \mu m$, $50 - 100 \ \mu m$ og > 100 μm (Figur 76).

For mikrokosmosforsøgene med vandfase og sediment samt mesokosmosforsøgene var medianværdien af de talte antal i de biocidbehandlede kosmer noget højere end i de ubehandlede kosmer for alle størrelsesgrupper. For mikrokosmosforsøget med vandfase alene blev der ikke set forskel i denne henseende.

For terbutryn blev der for mikrokosmosforsøg med vandfase og sediment set en tendens til, at organismerne blev mindre med stigende koncentration. Dette blev også set for blandingen af biocider (MIX) (Figur 75). De to andre kosmosmosforsøg viste ikke nogen tilsvarende tendens, og det er derfor usikkert hvor vidt denne trend skyldes en virkning af terbutryn, eller blot er tilfældig variation i kosmernes samfund af pennate diatoméer. For de andre biocider blev der ikke set tydelige tendenser til, at størrelsesfordelingen blev påvirket af biocidindholdet.



Figur 74 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af gruppen pennate diatoméer i mikrokosmer med vandfase alene



Figur 75 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af gruppen pennate diatoméer i mikrokosmer med sediment og vandfase



Figur 76 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af gruppen pennate diatoméer i mesokosmer i sø B1

Størrelsesfordeling af individer i slægten Euglena

For slægten *Euglena* var små individer mere almindelige i de behandlede kosmer end i de ubehandlede (Figur 77). Der blev ikke set systematik i forhold til, at organismer blev mindre med stigende koncentration af tilsat biocid. Snarere tværtimod pegede data i modsat retning, altså at størrelsesfordelingerne i kosmer der havde modtaget de højeste biocidkoncentrationer lignede de blanke mere end de kosmer, der havde modtaget mindre koncentrationer.





Størrelsesfordeling af individer i slægten Trachelomonas

For slægten *Trachelomonas* var der generelt stor variation i størrelsesfordelingerne kosmerne imellem (Figur 78). Således var *Trachelomonas* markant mindre i Blank 1 end i Blank 2. Her skal det erindres, at Blank 1 havde en stor baggrund af carbendazim frigivet fra sedimentet (max værdi på 759 ng L⁻¹). Generelt blev der ikke set systematik i organismernes størrelse i forhold til den tilsatte koncentration af biocid.



Figur 78 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af gruppen *Trachelomonas* i mesokosmer i sø B1

Størrelsesfordeling af individer i rækken Cryptophyta

For rækken *Cryptophyta* var der ligeledes en stor variation i størrelsesfordelingerne kosmerne imellem (Figur 79). Som for var *Trachelomonas*, var *Cryptophyta* markant mindre i Blank 1 end i Blank 2, hvilket viser den store variabilitet kosmerne i mellem, uafhængig af koncentrationen af biocidbehandlingen.



Figur 79 Relativ fordeling af størrelse og biovolumen af rækken Cryptophytes i mesokosmer i sø B1

3.5.5 Taxonomisk sammensætning af fytoplanktonsamfundene

l dette afsnit diskuteres den overordnede taksonomiske sammensætning af fytoplanktonsamfundene i alle tre typer forsøg: Mikrokosmer med vandfase alene, mikrokosmer med sediment og vandfase, samt mesokosmosforsøg i en regnvandssø. De enkelte undersøgelser er gennemgået i detalje i afsnit 3.5.1 - 3.5.3.

Fytoplanktontaxa og taxonomiske grupper i alle de tre typer forsøg kunne henføres til 8 rækker: *Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenophyta, Chrysophyta, Cryptophyta, Xanthophyta, Dinophyta* og *Bacillariophyta* (Tabel 21, Tabel 23, Tabel 25). I mikrokosmosforsøgene med vandfasen alene blev der fundet 46 taxa, i mikrokosmosforsøgene med sediment og vandfasen blev der fundet 51 taxa, mens der i mesokosmerne placeret i regnvandssø B1 blev fundet 49 taxa. I mikrokosmer med vandfase alene var 27 taxa til stede i mere end halvdelen af de 18 kosmer, mens de resterende 19 blev fundet af og til. For de to andre typer forsøg var tallene tilsvarende, idet der her var 23 henholdsvis 22 taxa til stede i mere end halvdelen af kosmerne. De fleste af de mest almindelige taxa hørte til rækken *Chlorophyta* (12-14, afhængig af forsøgstype) samt til rækken *Cyanophyta* (3-6, afhængig af forsøgstype). For mesokosmosforsøgene udgjorde *Euglenophyta* endvidere en væsentlig andel af de hyppigt fundne taxa (6 taxa).

Datasættene indikerede, at den taxonomiske sammensætning i forhold til hvorvidt et taxon var til stede eller ej, ikke, eller kun i mindre grad, var påvirket af de tilsatte biocider. Set på rækkeniveau korellerede den taxonomiske sammensætning af fytoplanktonsamfundene ikke med det totale biocidindhold i kosmerne. Der var for alle tre forsøg en tendens til, antallet af taxa faldt med stigende terbutryn koncentration. For de tre andre biocider syntes der ikke at være en tilsvarende sammenhæng. Alt i alt skal man være varsom at konkludere for meget på disse observationer, blandt andet fordi de blanke udviste relativ stor indbyrdes variation, og at tilfældige udviklinger i kosmerne derfor kan have forstyrret billedet af en mulig effekt. Mens det ikke kan udelukkes, at der er et sammenhæng mellem terbutryn koncentration og antal taxa, er datasættet følgelig ikke entydigt.

Ved slutningen af hvert af de tre kosmosforsøg var der en del variation mellem de individuelle kosmer i form af antal organismer og biovolumen (Figur 64, Figur 66, Figur 69). Variationen var mindst for det simpleste system – mikrokosmerne med vandfase alene – og størst for det mest komplekse system – mesokosmerne i regnvandssø B1. Hvorvidt en øget biocidkoncentration førte til ændret antal individer eller biovolumen er noget mere usikkert. Mens nogle aspekter af forsøgene peger i den retning, er der andre, der ikke gør, eller endog peger i modsat retning.

Figur 80 til Figur 85 viser klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for den log-tranformerede relative sammensætning af fytoplanktonsamfundene i mikro- og mesokosmerne. I mikrokosmer med vandfase alene (Figur 80 og Figur 81) samt mikrokosmer med vandfase og sediment (Figur 82 og Figur 83) skiller MIX 1000 sig ud for det relative biovolumen. Resten af mikrokosmosbehandlingerne viser ingen tydelig tendenser. For mesokosmerne grupperer IRG 1000 og DR 1000 sig i en gruppe der skiller sig ud fra resten. Ellers synes der at være nogen tydelig tendens til, at fytoplanktonsammensætningen grupperer sig efter den behandling de har fået, heller ikke når de faktiske biocidkoncentrationer tages i betragtning (Tabel 24).



Figur 80 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplanktonsammensætning i microkosmer med vandfase alene – log-tranformeret relativt antal af individer i rækker fundet i kosmerne



Figur 81 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplanktonsammensætning i microkosmer med vandfase alene – log-tranformeret relativt biovolumen af rækker fundet i kosmerne



Figur 82 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplanktonsammensætning i microkosmer med vandfase og sediment – log-tranformeret relativt antal af individer i rækker fundet i kosmerne



Figur 83 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplanktonsammensætning i microkosmer med vandfase og sediment – log-tranformeret relativt biovolumen af rækker fundet i kosmerne



Figur 84 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplanktonsammensætning i mesokosmer placeret i sø B1 – log-tranformeret relativt antal af individer i rækker fundet i kosmerne



Figur 85 Klassisk Bray-Curtis cluster-analyse for fytoplanktonsammensætning i mesokosmer placeret i sø B1 – log-tranformeret relativt biovolumen af rækker fundet i kosmerne

Der blev udført DCA-analyse for de samme datasæt som cluster-analyserne. Disse udviste ingen tydelige tendenser andre end, at MIX 1000 for mikrokosmerne også her grupperede for sig selv.

Taksonomisk sammensætning og artsdiversitet

I et studie af Genevesøen korrelerede Gregorio et al. (2012) målte koncentrationer af 14 herbicider med fytoplanktonslægter ved koncentrationsniveau på 1 – 25 ng L⁻¹, altså svarende til de laveste niveauer i nærværende undersøgelses mikro- og mesokosmosforsøg. Gregorio et al.'s studie viste ikke nogen direkte toksicitet af herbiciderne mod fytoplankton men indikerede, at forskellige arter havde forskellig følsomhed overfor bestemte substanser. For 5% af arterne blev der set toksiske effekter af terbutryn og diuron mellem 30 og 50 ng L⁻¹. Berard et al. (2003) undersøgte effekten af forskellige koncentrationer af cybutryne (irgarol 1051) på visse fytoplanktonarter i laboratorie nanokosmer. Studiet viste, at stoffets effekt afhang meget af den konkrete art. En lignende konklussion blev draget af Ma et al. (2002), der undersøgte forskellige algearters følsomhed overfor 12 pesticider. For eksempel fandt de at EC50 koncentrationer for Asterionella Formosa, Navicula accomoda, Scenedesmus acutus, og Chlorella vulgaris efter 96 timers eksponering var henholdsvis >253 μ g L⁻¹, 0,5 μ g L⁻¹, 5,1 μ g L⁻¹ og 1,5 μ g L⁻¹. For det studie blev arter samlet fra cybutryne forurenede lokaliteter så vel som referencelokaliteter, og de fandt, at arter i fytoplanktonsamfund der før havde været udsatte for cybutryne forurening var mere tolerante overfor cybutryne. Dette indikerer, at arter kan udvikle tolerance overfor visse toksiske stoffer.

Knauer et al. (2009) udførte udendørs mesokosmosforsøg med konstante belastninger af atrazine (70 μ g L⁻¹), isoproturon (14 μ g L⁻¹) og diuron (5 μ g L⁻¹) på fytoplanktonsamfund. Selv ved disse koncentrationer, der var markant højere end dem anvendt i nærværende studie, blev der ikke set forskel i fytoplanktonsamfundenes sammensætning efter 5 døgns eksponering. Efter 12 døgns eksponering så de en effekt på artsdiversiteten, idet enkelte følsomme arter forsvandt, mens hovedparten af arterne forblev i deres mesokosmer.

Leboulanger et al. (2011) undersøgte naturlige planktonsamfund i tropiske ferskvandsmikrokosmer. De undersøgte effekten af diuron i koncentrationer på 2,2 μ g L⁻¹ og 11 μ g L⁻¹, uden at finde en effekt på den taxonomiske diversitet af fytoplankton. Antal og biovolumen af fytoplankton faldt i forsøgene med diuron tilsætning.

Fytoplanktonrækkers respons på forurening

Mohr et al. (2008) udførte forsøg med indendørs mesokosmer, hvor effekten af cybutryne (irgarol 1051) i koncentrationer fra 0.04 til 5 μ g L⁻¹ på fytoplankton, perifyton og økosystem funktion blev undersøgt. I det studie fandt de, at EC50 for rækken *Chlorophyta* var 0,34 μ g L⁻¹. Hyppigheden af *Scenedesmus sp.* var størst i kosmer med højere cybutryne koncentration. I slutningen af deres forsøg observerede de et fald i biovolumen for diatomé-samfundet, mens grønne og blå-grønne alger fik øget biovolumen i de mere belastede kosmer.

Struve et al. (1991) undersøgte flere koncentrationer af terbutryn i mesokosmer: $6 \ \mu g \ L^{-1}$, $12 \ \mu g \ L^{-1}$, $24 \ \mu g \ L^{-1}$. I det studie var den gennemsnitlige fytoplanktontæthed ikke væsentligt påvirket af terbutryn. Kun klorofyl-a koncentrationen var lavere ved $6 \ \mu g \ L^{-1}$. Deres studie viste et lavere antal af euglenophyter og dinoflagellater i terbutryn behandlede kosmer i forhold til kontrol kosmerne, mens antallet af grønne og gul-grønne alger steg. Terbutryn så ikke ud til at have en effekt på cyanobakterier. Ligesom i nærværende undersøgelses mikro- og mesokosmer, var variabiliteten i deres kosmer stor mellem såvel de forskellige behandlinger som mellem replikater af behandlinger.

I nærværende studie viste cluster-analyserne ingen klare tendenser til, at biocid-behandlede kosmer var mere lig hinanden end ikke-behandlede kosmer. Hverken med hensyn til typen af biocid eller med hensyn til de anvendte koncentrationer. Kontrolkosmerne grupperede sig heller ikke for sig selv i forhold til de behandlede kosmer. En mulig forklaring herpå kunne være, at alle tre kosmosforsøg blev udført på vand med organismer fra en regnvandssø, der vides at modtage væsentlige mængder af biocider (Bollmann et al., 2014), et forhold der blev yderligere bekræftet af de forskellige biocidmålinger, der indgår i nærværende studie. Denne biocidbelastning kunne være en medvirkende forklaring på, at der kun blev set beskedne, ikke-signifikante forskelle mellem kosmer behandlet med biocider og de blanke kosmer, idet fytoplanktonsamfundet kan have udviklet tolerance overfor de undersøgte biocider.

Der blev fundet en, om end ikke entydig, tendens til, at slægten Scenedesmus og muligvis også gruppen af pennate diatoméer blev mindre som en effekt af terbutryn. Om andre taxas størrelsesfordeling også blev påvirket vides ikke, idet kun disse to blev kvantificeret i størrelsesgrupper i alle tre kosmer.

4. Konklusion

Projektet har adresseret dels sorption, forsinkelse og omsætning af biocider i sediment fra regnvandssøer og filterjorde, og dels hvorvidt forskelle i søernes algesamfund afspejler forskelle i søernes biocidbelastning.

Med hensyn til den første del viste projektet, at søernes bundsedimenter spiller en væsentlig rolle for tilbageholdelse og forsinkelse af biocider før den videre udledning til en nedstrøms recipient. Der blev undersøgt sorptionskapacitet af 4 biocider (terbutryn, cybutryne, diuron og carbendazim) til sedimenter fra 6 søer (2 med beboelseskvarter-oplande, 2 med industrikvarterer-oplande og 2 med motorvej-oplande). Generelt var der en vis sammenhæng for sorptionen af de 4 biocider søerne imellem, hvor for eksempel søer med høj sorptionskapacitet for ét biocid også havde høj sorptionskapacitet for de andre biocider. Dette sammenhæng var stærkere når sorptionen blev normaliseret til sedimentets organiske stof end til dets totale tørstofindhold. Indholdet af organisk stof i sedimentet kunne ikke forklare hele variationen, og parametre som pH viste sig også at spille en væsentlig rolle. Endvidere tydede undersøgelserne på, at andre forhold som for eksempel indholdet af lermineraler kunne have bidraget til sorptionen.

Forsøg med sorption til aflejret sediment og omsætning heri viste, at de undersøgte 4 biocider blev fjernet fra vandfasen med pseudo-førsteordens halveringstider på omkring 2-3 uger, mens omsætningen i sedimentet var noget langsommere, typisk med pseudo-førsteordens halveringstider omkring 1-5 måneder. Undersøgelserne viste endvidere, at det komplicerede samspil mellem diffusion af biocid i sedimentet, sorption til sedimentet, samt den biologiske nedbrydning heri kunne beskrives tilfredsstillende ved en 1-dimensionel boksmodel. Da boksmodellen er ganske beregningstung, blev den simplificeret, så den kunne bruges til simulering af lange historiske tidsserier. Disse simuleringer viste, at sorption til sedimentet spiller en stor rolle i at udligne spidsbelastninger på en nedstrøms recipient, således at spidsbelastninger i udløb fra en sø er markant mindre end spidsbelastningerne i indløbet. Omsætning i sediment spiller derimod en mindre rolle. Det blev konkluderet, at den samlede udledte masse af biocider kun bliver reduceret i mindre omfang i en urban regnvandssø.

Sorption af 9 biocider til kolonner med designet filterjord blev undersøgt (methylisothiazolinone, benzisothiazolinone, octylisothiazolinone, diuron, isoproturon, terbutryn, tebuconazole, propiconazole, mecoprop). Jorden bestod dels af sand og dels af sand tilsat spagnum i to koncentrationer. Her viste det sig, at graden af sorption blev styret af indholdet af det organiske stof, altså spagnummet. Der var en del af biociderne, der kun sorberede i ringe grad, og filterkolonnerne udviste derfor en ringe retention heraf. Omsætning af biociderne blev undersøgt på samme materialer. Her blev kolonnerne podet med renset spildevand for at sikre biologisk aktivitet. Omsætningsraterne i filterkolonnerne rangerede fra pseudo-førsteordens halveringstider på 11/2 måned (propiconazole) til knap 2 år (cybutryne, mecoprop, isoproturon). Hydrauliske opholdstider i jordfiltre er typisk i størrelsesorden dage til, i sjældne tilfælde, uger, og under høj belastning kan opholdstiden komme helt ned på minutter til timer. Med de fundne omsætningsrater må der derfor forventes en beskeden omsætning i filtrene. Jordfiltrenes primære funktion bliver derfor at retardere koncentrationerne i tilløbet, så spidsbelastninger på recipienter reduceres, mens den samlede masseudledning kun bliver reduceret i mindre omfang. Filterjord er en kunstig blanding af jord, der designes til at aflede og rense afstrømmet regnvand. Undersøgelsen viser, at et højere indhold af organisk stof vil fremme filterjordens evne til at binde biociderne. Filterjorde har endvidere potentiale til at omsætte visse biocider, men opholdstiden i jorden skal ganske lang for at opnå en mærkbar reduktion.

Feltundersøgelserne af biocider i urbane søer viste at de målte biocider forekom i søerne i koncentrationer under 100 ng L⁻¹, og i de fleste tilfælde under 20-30 ng L⁻¹. Som forventet var koncentrationen af biocider i søer, der modtager vand fra motorveje, generelt lave, om end der forekom enkelte høje koncentrationer af diuron samt 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazoline-3- one. I mesokosmos undersøgelser i én af regnvandssøerne med boligkvarteropland blev der endvidere fundet høje koncentrationer af carbendazim. Carbendazim steg af ukendte årsager i alle mesokosmer under forsøgene. To mulige forklaringsscenarier blev identificeret. Det ene scenarium går på, at carbendazim blev udledt med en tidligere hændelse, sorberet i sedimentet, for derpå igen at blive frigivet under mesokosmosforsøgene. Det anden og nok mere sandsynlige scenarium går på, at der før mesokosmosforsøgene har været en udledning af benomyl. Benomyl nedbrydes relativt hurtigt til carbendazim. Stoffet må ikke anvendes i EU, og er også længe udfaset i fx USA, men kan anvendes som fungicid til bl.a. behandling af grøntsager. Muligvis har benomyl været ulovligt anvendt i en have i oplandet og er derpå blevet ført med en tidligere regnhændelse til søen.

Undersøgelse af de bentiske diatomé-samfund i de 9 regnvandssøer viste 49 identificerede diatomé-slægter. De 5 prøvetagningssteder i hver sø udviste stor grad af similaritet. For den videre analyse blev de derfor samlet til én prøve per sø. Prøverne fra de 9 søer udviste høj grad af similaritet søerne imellem. Prøverne fra de 3 motorvejssøer udviste den største grad af indbyrdes similaritet, mens der var mindre similaritet mellem prøver fra motorvejssøer og prøver fra søer med industrioplande eller beboelsesoplande. Forskellen mellem prøver fra søer, der modtager vand fra beboelsesoplande og industrioplande, var ikke signifikant. DCA-analyse af datasættet indikerede korrelation mellem analysens mest forklarende akse og mecoprop, terbutryn og propiconazole. Aksens forklaringsværdi var beskeden (eigenværdi på 0,25), og resultatet skal derfor tages med forbehold.

I de 10 søer undersøgt for fytoplanktonsamfund, blev der fundet 105 taxa. Som for diatoméer var de 5 prøvetagningssteder i hver sø ret ens og blev derfor samlet til én prøve per sø. Når fytoplanktontaxa i søerne blev grupperet efter række, var similaritet målt på såvel det relative antal individer som deres relative biovolumen generelt lille regnvandsøerne imellem. For fytoplankton blev der ikke set en tydelig tendens til, at søer grupperede efter typen af opland, de modtog vand fra. DCA-analyse af fytoplanktonsamfundene viste ikke nogen klar tendens til korrelation mellem analysens mest forklarende akser og de 13 målte biocider. Fytoplankton-samfundenes variation søerne imellem må derfor tilskrives andre parametre end biocider.

I mikrokosmosforsøgene med vandfase alene blev der fundet 46 taxa, mens der blev fundet 52 taxa i mikrokosmer med vandfase og sediment og 40 taxa i mesokosmosforsøgene. Under ét tydede disse undersøgelser ikke på korrelation mellem de tilsatte biocider og sammensætningen af taxa i kosmerne. Enkelte tendenser kunne ses for nogle af forsøgene, i form af at kosmer med de højeste koncentrationer af biocider nogen gange skilte sig ud. Tendenserne var langt fra entydige, og kan skyldes tilfældige variationer i kosmerne. Der blev endvidere set en mulig tendens til, at slægten *Scenedesmus* og muligvis også gruppen af pennate diatoméer blev påvirket i størrelse af biociderne i kosmerne. Under ét tydede undersøgelserne af alger i regnvandssøer på, at fytoplanktonsamfundene på det undersøgte taksonomiske niveau ikke afspejlede forekomsten af biocider i regnvandssøerne. Heller ikke i kontrollerede forsøg kunne der ses nogen tydelig sammenhæng mellem de undersøgte, miljørealistiske biocidkoncentrationer og fytoplanktonsamfundenes sammensætning. Biocider i afstrømmet regnvand kan muligvis have påvirket fordelingen af diatomé-slægter i undersøgelsens søer. Regnvandssøer er påvirket af mange andre faktorer end biocider, faktorer der ikke har været medtaget i nærværende undersøgelse. På trods af at der blev set tendenser til sammenhæng mellem visse biocider og diatomérsamfund, behøver disse sammenhænge ikke at have været forårsaget af biocider i afstrømmet regnvand. De kan i stedet have været forårsaget af andre parametre, der korrelerede med de målte biocider, eller simpelthen være forårsaget af tilfældig variation i datasættet.

5. Perspektivering

Moderne byggematerialer og bygningsstil kræver, at begroninger med alger og svampe kan holdes i ave. For at beskytte overflader mod uønsket biologisk vækst, blander producenterne biocider i bygningsmaterialer, der kommer i kontakt med vind og vejr. Biocider blandes endvidere i maling, produkter og materialer for at konservere disse, så de også i åbnet tilstand har lang holdbarhed. Biocider i maling, produkter og bygningsmaterialer er formentlig kommet for at blive, og det er derfor væsentligt at undersøge den effekt de måtte have på miljøet.

Under regn bliver biociderne frigivet til regnvandet, der strømmer på overfladerne, og transporteret med vandet til recipient. Da biociderne er målrettet mod alger, svampe og bakterier, kan de potentielt have en effekt på disse organismer i recipienten. På grund af fortynding med andet regnvand, er koncentrationerne, der når recipienten, markant lavere end i vandet på de behandlede overflader. De gennemførte undersøgelser af biociders skæbne og effekt er derfor udført ved lave koncentrationer, svarende til hvad der tidligere har været målt i afstrømmet regnvand.

Selvom biocidkoncentrationerne er små i forhold til hvad der er dødeligt for organismerne, kan biociderne stadig have en effekt på disses vækst og deres evne til at konkurrere om ressourcer. Nærværende projekt så på samfund af fytoplankton og diatoméer ned til slægtsniveau – hvor en sådan identifikation var gennemførlig. På dette niveau kunne der ikke identificeres nogen klar effekt af biociderne. En grund hertil kan være, at der ikke findes en sådan effekt ved de undersøgte koncentrationer. En anden grund kan være, at det kun er bestemte arter der påvirkes, og derpå blot bliver substitueret af andre, mere tolerante arter indenfor samme slægt eller højere taxonomiske niveau, der udfører samme funktion i økosystemet.

Alger, specielt diatoméer, kan benyttes som indikatorer af biologisk vandkvalitet for miljøkvalitetsklasser anvendt i Vandrammedirektivet (høj, god, moderat, ringe, dårlig). Det er muligt, at diatoméer også kan benyttes som indikatorer for forekomst af visse biocider og pesticider. Det er muligt, at der kan identificeres en række arter af diatoméer, der til sammen kan fortælle, hvorvidt et vandløb eller en sø er lavt, moderat eller højt belastet med det pågældende stof.

I forhold til biocidernes skæbne efter at de er blevet frigivet til regnvand, har nærværende rapport set på delstrømmen, der føres til overfladerecipient. Der er en anden delstrøm, som kvantitativt set formentlig spiller en endnu større rolle, nemlig den del af vandet, der strømmer fra facaderne og direkte ned i den underliggende jord. Da vandet direkte på facaden har en biocidkoncentration, der er adskillige dekader højere, end hvad der findes i regnvandssøer, kan sådanne lokaliteter føre til hot-spots for tilførsel af biocider til grundvandet. Omfanget af denne biocidbelastning af grundvandet er ukendt, men kan under omstændigheder være ganske væsentlig. Særligt problematisk vil det formentlig være, når byjorden, som vandet siver ned i, er fattigt på komponenter, der kan sorbere biociderne, typisk ler eller organisk stof. Der er behov for at denne transportvej for biocider fra kilde til miljø belyses nærmere.

6. Referencer

- Ackley JW, Meylan PA (2010). Watersnake eden: Use of stormwater retention ponds by mangrove salt marsh snakes (Nerodia Clarkii Compressicuada) in urban Florida. Herpetological conservation and biology, 5 (1), 17–22.
- Alister C, Araya M, Kogan M (2011). Effects of physicochemical soil properties of five agricultural soils on herbicide soil adsorption and leaching. Ciencia E Investigation Agraria, 38(2): 243-251

Algaebase (2016). http://www.algaebase.org/. SITE © 1996 - 2016 M.D. Guiry.

- APHA, AWWA, WEF (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition.
- Azejjel H, Aatouf N, Draoui K (2008). Influence of soil properties on the adsorption of two ionisable herbicide by Moroccan soils. Fresenius environmental bulletin, 17(10A): 1627–1633
- Bannerman RT, Owens DW, Dodds RB, Hornewer NJ (1993). Sources of pollutants in Wisconsin stormwater. Wat. Sci. Tech, 28 (3-5), 241-259.
- Barriuso E, Calvet R, Cerri C, Feller CH (1992). Sorption of atrazine, terbutryn and 2,4-D herbicides in two Brazilian Oxisols. Geoderma, 53(1-2): 155–167
- Bérard A, Dorigo U, Mercier I, Becker-van Slooten K, Grandjean D, Leboulanger C (2003). Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. Aquatic Toxicology, 90: 109–120
- Bester K, Banzhaf S, Burkhardt M, Janzen N, Niederstrasser B, Scheytt T (2011). Activated soil filters for removal of biocides from contaminated run-off and waste-waters. Chemosphere, 85(8): 1233–1240
- Bester K, Schäfer D (2009). Activated soil filters (biofilters) for the elimination of xenobiotic compounds (micro-pollutants) from storm- and waste waters. Water Research, 43: 2639-2646
- Bester K, Vollertsen J, Bollmann UE (2014). Water driven leaching of biocides from paints and renders – Methods for the improvement of emission scenarios concerning biocides in buildings. The Danish Environmental Protection Agency, Pesticides Research no. 156, pp. 102. ISBN 978-87-93178-11-3
- Bollmann UE, Vollertsen J, Carmeliet J, Bester K (2014). Dynamics of biocide emissions from buildings in a suburban stormwater catchment - Concentrations, mass loads and emission processes. Water Research, 56:66-76
- Bollmann UE, Minelgaite G, Schlusener M, Ternes T, Vollertsen J, Bester K (2016). Leaching of terbutryn and its photodegradation products from artificial walls under natural weather conditions. Environmental Science & Technology, 50(8): 4289-95.
- Bronner G, Goss KU (2011). Predicting sorption of pesticides and other multifunctional organic chemicals to soil organic carbon. Environ. Sci. Technol., 45(4): 1313–1319
- Brand AB, Snodgrass JW (2010). Value of artificial habitats for amphibian reproduction in altered landscapes. Conservation Biology, 24(1): 295–301.
- Bucheli T, Müller SR, Voegelin A, Schwarzenbach RP (1998). Bituminous roof sealing membranes as major sources of the herbicide (R,S)-Mecoprop in roof runoff waters: potential contamination of groundwater and surface waters. Environ. Sci. Technol., 32: 3465-3471.
- Burkhardt M (2008). Building facades can leach toxic pollutants into watercourses. TRAC-Trends in Analytical Chemistry.27: 10.
- Burkhardt M, Junghans M, Zuleeg S, Schoknecht U, Lamani X, Bester K, Vonbank R, Simmler H, Boller M (2009). Biozide in Gebäudefassaden – ökotoxikologische Effekte, Auswaschung und Belastungsabschätzung für Gewässer (Biocides in building facades – ecotoxicological effects, leaching and environmental risk assessment for surface waters).

Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, 21, 36-47.

- Burkhardt M, Zuleeg S, Vonbank R, Bester K, Carmeliet J, Boller M, Wangler T (2012). Leaching of biocides from facades under natural weather conditions. Environmental Science & Technology, 46(10): 5497-5503
- By- og Landskabsstyrelsen (2010). Punktkilder 2008. Fagdatarapport for punktkilder i forbindelse med det nationale overvågningsprogram NOVANA, ISBN 978-87-92548-86-3
- Cattaneo A, Couillard Y, Wunsam S, Fortin C (2011). Littoral diatoms as indicators of recent water and sediment contamination by metals in lakes. J. Environ. Monit., 13: 572-582.
- Chen X, Yang X, Dong X, Liu E (2012). Influence of environmental and spatial factors on the distribution of surface sediment diatoms in Chaohu Lake, Southeast China. Acta Bot. Croat. 71 (2), 299-310.
- Chen X, Li C, McGowan S (2014). Diatom response to heavy metal pollution and nutrient enrichment in an urban lake: evidence from paleolimnology. Ann. Limnol. Int. J. Lim. 50, 121-130.
- Crawford KD, Weinstein JE, Hemingway RE, Garner TR, Globensky G (2010). A Survey of Metal and Pesticide Levels in Stormwater Retention Pond Sediments in Coastal South Carolina. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58(1): 9-23
- Cronberg G, Annadotter H (2006). A photo guide and synopsis of their toxicology. ISSHA and IOC of UNESCO, Copenhagen. 106 pp.
- Dansk Standard (1991). DS 223. Vandundersøgelse. Bestemmelse af summen af nitrit- og nitratnitrogen. Dansk Standard
- Dansk Standard (2004). DS/EN ISO 6878:2004 (2004). Water quality Determination of phosphorus – Ammonium molybdate spectrometric method. Dansk Standard
 DARES (2004). Enumeration protocol, Version 1.0.
 - http://craticula.ncl.ac.uk/DARES/methods/DARES Protocol Diatom Counting.pdf
- Dechesne M, Barraud S, Bardin J-P (2004). Spatial distribution of pollution in an urban stormwater infiltration basin. Journal of Contaminant Hydrology 72(1-4): 189-205
- Delle Site A (2001). Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. Journal of physical and chemical reference data, 30(1): 187-439
- De Wilde T, Spanoghe P, Ryckeboer J, Springael D (2010). Transport and degradation of pesticides in a biopurification system under variable flux, part I: A microcosm study. Environmental Pollution, 158(10): 3309-3316
- Dixit SS, Dickman MD (1986). Correlation of surface sediment diatoms with the present lake water pH in 28 Algoma lakes, Ontario, Canada. Hydrobiologia 131: 133-143.
- Escolà Casas M, Bester K (2015). Can those organic micro-pollutants that are recalcitrant in activated sludge treatment be removed from wastewater by biofilm reactors (slow sand filters)? Science of the Total Environment, 506–507: 315-322
- EU (2013). Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy
- EU (2016) database on biological active substances:

http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/biocidal-active-substances

- Farenhorst A (2006). Importance of soil organic matter fractions in soil-landscape and regional assessments of pesticide sorption and leaching in soil. Soil Science Society of America Journal, 70(3): 1005-1012
- Fischer D, Charles EG, Baehr AL (2003). Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins. Journal of Environmental Engineering, 129(5): 464-471
- Fødevarestyrelsen (2015). Pesticidrester i fødevarer 2014. Resultater fra den danske pesticidkontrol. Teknisk rapport. København, Danmark
- Gasperi J, Sebastian C, Ruban V, Delamain M, Percot S, Wiest L, Mirande C, Caupos E, Demare D, Kessoo MD, Saad M, Schwartz JJ, Dubois P, Fratta C, Wolff H, Moilleron R,

Chebbo G, Cren C. Millet M, Barraud S, Gromaire MC (2014). Micropollutants in urban stormwater: occurrence, concentrations, and atmospheric contributions for a wide range of contaminants in three French catchments. Environ. Sci. Pollut. Res., 21(8): 5267-5281.

- Gonzalo M, Fernandez M de los R (2012). Diatoms as Indicators of Water Quality and Ecological Status: Sampling, Analysis and Some Ecological Remarks, Ecological Water Quality – Water Treatment and Reuse, Dr. Voudouris (Ed.), ISBN: 978-953-51-0508-4, InTech, pp. 508
- Gregorio V, Büchi L, Anneville O, Rimet F, Bouchez A, Chèvre N (2012). Risk of herbicide mixtures as a key parameter to explain phytoplankton fluctuation in a great lake: the case of Lake Geneva, Switzerland. Ecotoxicology, 21: 2306–2318
- Hatt BE, Fletcher TD, Deletic A (2009). Pollutant removal performance of field-scale stormwater biofiltration systems. Water Science and Technology, 59(8): 1567-1576
- Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollingher D, Zohary T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol., 35, 403–424
- Hvitved-Jacobsen T, Vollertsen J, Nielsen A H (2010). Urban and Highway Stormwater Pollution – Concepts and Engineering. CRC Press/Taylor & Francis Group, pp 347, ISBN: 978-1-4398-2685-0
- Istenič D, Arias CA, Vollertsen J, Nielsen AH, Wium-Andersen T, Hvitved-Jacobsen T, Brix H (2012). Improved urban stormwater treatment and pollutant removal pathways in amended wet detention ponds. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 47: 1466-1477.
- Jang YC, Jain P, Tolaymat T, Dubey B, Singh S, Townsend T (2010). Characterization of roadway stormwater system residuals for reuse and disposal options. Science of the Total Environment 408(8): 1878–1887
- Javakul A, Grimes AJ, Rushforth SR (1983). Diatoms in sediment cores in Utah lake, Utah, U.S.A. Hydrobiologia 98, 159-170.
- Janzen N, Banzhaf S, Scheytt T, Bester K (2009). A vertical soil filter for the elimination of micro pollutants from storm and waste water. Chemosphere. 77: 1358-1365
- John DM, Whitton BA, Brook AJ (2011). The Freshwater Algal Flora of the British Isles, An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, Second Edition. Cambridge University Press, ISBN 978-0-521-19375-7. 878p.
- Kah M, Brown CD (2007). Prediction of the Adsorption of Ionizable Pesticides in Soils. Journal of agricultural and food chemistry, 55(6): 2312–2322
- Kelly MG, Cazaubon A, Coring E, Dell'Uomo A, Ector L, Goldsmith B, Guasch H, Hürlimann J, Jarlman A, Kawecka B, Kwandrans J, Laugaste R, Lindstrøm E-A, Leitao M, Marvan P, Padisak J, Pipp E, Prygiel J, Rott E, Sabater S, Van Dam H, Vizinet J (1998). Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. Journal of Applied Phycology, 10, 215-224.
- Kelly M (2000). Identification of common benthic diatoms in rivers. Field studies, 9 (4), ISBN 1 85153 208 0, 583-700.
- Knauer K, Leimgruber A, Hommen U, Knauert S (2009). Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. Aquatic Toxicology 96: 256–263
- Laird K, Das B, Kingsbury M, Moos TM, Pla-Rabes S, Ahad JME, Wiltse B, Cumming BF (2013). Paleolimnological assessment of limnological change in 10 lakes from northwest Saskatchewan downwind of the Athabasca oils sands based on analysis of siliceous algae and trace metals in sediment cores. Hydrobiologia, 720, 55-73.
- Lauridsen TL, Søndergaard M, Jensen JP, Jeppesen E (2005). NOVANA Undersøgelser i søer. Teknisk anvisning fra DMU, nr. 22
- Leboulanger C, Bouvy M, Carré C, Cecchi P, Amalric L, Bouchez A, Pagano M, Sarazin G (2011). Comparison of the Effects of Two Herbicides and an Insecticide on Tropical Freshwater Plankton in Microcosms. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 61: 599–613
- Leisenring M, Clary J, Hobson P (2014). International stormwater best management practices (BMP) database pollutant category statistical summary report solids, bacteria, nutrients, and metals. International Stormwater BMP Database, p. 39
- Le Viol I, Mocq J, Julliard R, Kerbiriou C (2009). The contribution of motorway stormwater retention ponds to the biodiversity of aquatic macroinvertebrates. Biol. Conserv. 142, 12: 3163-3171
- Liu Y, Xu Z, Wu X, Gui W, Zhu G (2010). Adsorption and desorption behavior of herbicide diuron on various Chinese cultivated soils. Journal of hazardous materials, 178(1-3): 462–468
- Lizotte RE, Shields FD, Knight SS, Bryant CT (2009). Efficiency of a modified backwater wetland in trapping a pesticide mixture. Ecohydrology, 2(3): 287-293
- Lu JH, Wu LS, Newman J, et al. Faber B, Merhaut DJ, Gan J (2006). Sorption and degradation of pesticides in nursery recycling ponds. Journal of Environmental Quality, 35(5): 1795-1802
- Ma J, Zheng R, Xu L, Wang S (2002). Dijerential Sensitivity of Two Green Algae, Scenedesmus obliqnus and Chlorella pyrenoidosa, to 12 Pesticides. Ecotoxicology and Environmental Safety, 52: 57–61
- McLeod S, Kells J, Putz G (2006). Urban Runoff Quality Characterization and Load Estimation in Saskatoon, Canada. J. Environ, Eng., 132(11): 1470-1481.
- Mestankova H, Escher B, Schirmer K, Gunten Uv, Canonica S (2011). Evolution of algal toxicity during (photo)oxidative degradation of diuron. Aquatic Toxicology, 101(2): 466–473
- Miljøstyrelsen (2016a). Bekæmpelsesmiddelstatistik 2014. Orientering fra Miljøstyrelsen nr. 13, 2016. København, Danmark
- Miljøstyrelsen (2016b). Salg af sprøjtemidler til brug i private haver 2014. Orientering fra Miljøstyrelsen nr. 14, 2016. København, Danmark
- Minelgaite M, Nielsen AH, Pedersen ML, Vollertsen J (2015). Photodegradation of three stormwater biocides. Urban Water Journal, online
- Mohr S, Schröder H, Feibicke M, Berghahn R, Arp W, Nicklisch A (2008). Long-term effects of the antifouling booster biocide Irgarol 1051 on periphyton, plankton and ecosystem function in freshwater pond mesocosms. Aquatic Toxicology, 90: 109–120
- Moisset S, Tiam SK, Feurtet-Mazel A, Morin S, Delmas F, Mazzella N, Gonzalez P (2015). Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. Environ. Sci. Pollut. Res., 22: 4046-4055.
- Moore MT, Kroger R, Cooper CM, Cullum RF, Smith S Jr, MA Locke (2009). Diazinon reduction and partitioning between water, sediment and vegetation in stormwater runoff mitigation through rice fields. Pest Management Science, 65(11): 1182-1188
- Nygaard G (2001). Dansk planteplankton. Tredje udgave ved Jørgen Kristiansen.Gyldendal, ISBN-13: 9788700499126, 36p.
- Paszko T (2012). Effect of pH on the adsorption of carbendazim in Polish mineral soils. Science of the total environment, 435-436: 222–229
- Pesce S, Martin-Laurent F, Rouard N, Robin A, Montuelle B (2010). Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization: incidence of runoff and soil erosion. Journal of Soils and Sediments, 10(4): 698-707
- Proia L, Morin S, Peipoch M, Romani AM, Sabater S (2011). Resistance and recovery of ricer biofilms receiving short pulses of Triclosan and Diuron. Science of the Total Environment, 409: 3129-3137.
- Rimet F, Bouchez A (2011). Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. Ecological Indicators, 11: 489-499.
- Robles-González IV, Fava F, Poggi-Varaldo HM (2008). A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and Sediments. Microbial Cell Factories, 7: article number 5
- Ruping W, Dickman MD (1991). Studies on the plankton and sediment diatoms in Xuanwu lake, Nanjing, China. Chin. J. Oceanol. Limnol., 9 (3), 277-289
- Sakkas VA, Shibata K, Yamaguchi Y, Sugasawa S, Albanis T (2007). Aqueous phototransformation of zinc pyrithione degradation kinetics and byproduct identification by liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1144(2): 175–182

- Scher O, Thiery A (2005). Odonata, Amphibia and environmental characteristics in motorway stormwater retention ponds (Southern France). Hydrobiologia 551: 237-251.
- Sheng G, Yang Y, Huang M, Yang K (2005). Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. Environmental pollution, 134(3): 457–463
- Spaulding SA, Lubinski DJ, Potapova M (2010). Diatoms of the United States. http://westerndiatoms.colorado.edu
- Stephansen DA, Nielsen AH, Hvitved Jacobsen T, Vollertsen J (2012). Bioaccumulation of heavy metals in fauna from wet detention ponds for stormwater runoff. In Highway and Urban Environment. Book Series: Alliance for Global Sustainability Series, vol. 19: 329-338. Editors: Rauch S, Morrison G M, ISBN 978-94-007-2539-3
- Stephansen DA, Nielsen AH, Hvitved-Jacobsen T, Pedersen ML, Vollertsen J (i tryk). Invertebrates in stormwater wet detention ponds - sediment accumulation and bioaccumulation of heavy metals have no effect on biodiversity and community structure. In press for Science of the Total Environment
- Struve MR, Scott JH, Bayne DR (1991). Effects of fluridone and terbutryn on phytoplankton and water-quality in isolated columns of water. Journal of aquatic plant management, 29: 67–76
- Sun S, Barraud S, Castebrunet H, Aubin J-B, Marmonier P (2015). Long-term stormwater quantity and quality analysis using continuous measurements in a French urban catchment. Water Research, 85, 432-442.
- Taylor JC, Harding WR, Archibald CGM (2007). A Methods Manual for the Collection, Preparation and Analysis of Diatom Samples, Version1.0. Report to the Water Research Commission. WRC Report TT 281/07. ISBN 1-77005-483-9.
- Tixier G, Lafont M, Grapentine L, Rochfort Q, Marsalek J (2011). Ecological risk assessment of urban stormwater ponds: Literature review and proposal of a new conceptual approach providing ecological quality goals and the associated bioassessment tools. Ecol. Indic. 11, 1497-1506
- US EPA (2001). Benomyl RED Facts. November 2001, EPA-738-F-02-001 https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/benomyl fs.html
- Vollertsen J, Lange KH, Pedersen J, Hallager P, Bruus A, Laustsen A, Bundesen VW, Brix H, Nielsen AH, Nielsen NH, Wium-Andersen T, Hvitved-Jacobsen T (2009a). Monitoring the startup of a wet detention pond equipped with sand filters and sorption filters. Water Science and Technology, 60(4): 1071-1079
- Vollertsen J, Åstebøl SO, Coward JE, Fageraas T, Nielsen AH, Hvitved-Jacobsen T (2009b). Performance and Modeling of a Highway Wet Detention Pond Designed for Cold Climate. Water Quality Research Journal of Canada, in 44(3): 253–262
- Vollertsen J, Hvitved-Jacobsen T, Haaning Nielsen A, Gabriel S (2012). Våde bassiner til rensning af separat regnvand – Baggrundsrapport. Pp. 71, www.separatvand.dk
- Wang P, Keller AA (2009). Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersible soil primary size fractions. Water Research, 43(5): 1448-1456
- Wittmer IK, Bader HP, Scheidegger R, Singer H, Lück A, Hanke I, Carlsson C, Stamm C (2010). Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. Water Research, 44(9): 2850-2862
- Wittmer IK, Scheidegger R, Bader HP, Singer H, Stamm C (2011a). Loss rates of urban biocides can exceed those of agricultural pesticides. Science of the Total Environment, 409(5): 920-932
- Wittmer IK, Scheidegger R, Stamm C, Gujer W, Bader HP (2011b). Modelling biocide leaching from facades. Water Research, 45(11): 3453-3460
- Wium-Andersen T, Nielsen AH, Hvitved-Jakobsen T, Vollertsen J (2011). Heavy metals, PAHs and toxicity in stormwater wet detention ponds. Water Science and Technology, 63(2): 503-511
- Wium-Andersen T, Nielsen AH, Hvitved-Jacobsen T, Kristensen NK, Brix H, Arias C, Vollertsen J (2012). Sorption media for stormwater treatment a laboratory evaluation of five

low-cost media for their ability to remove metals and phosphorous from artificial stormwater. Water Environment Research, 84(7):605-616

- Wium-Andersen T, Nielsen AH, Hvitved-Jacobsen T, Brix H, Arias CA, Vollertsen J (2013).
 Modeling the eutrophication of two mature planted stormwater ponds for runoff control.
 Ecological Engineering, 61, Part B: 501-614
- Yousef YA, Hvitved-Jacobsen T, Sloat J, Lindeman W (1994). Sediment accumulation in detention or retention ponds. The Science of the Total Environment, 146/147, 451-456.

Biocider i urbane småsøer

Rapporten – "Biocider i urbane småsøer" – viser, at sedimentet i regnvandssøer i byer spiller en væsentlig rolle for tilbageholdelsen af biocider, før regnvandet ledes ud i det naturlige vandmiljø.

De konstruerede regnvandssøger og filterjorde er vigtige i forbindelse med afledning af regnvand fra byer, og de finder stadig større udbredelse i forbindelse med klimatilpasning og reduktion af byernes påvirkning af det naturlige vandmiljø.

Rapporten viser i hvor stor udstrækning biocider tilbageholdeles og omsættes i regnvandssøer og filterjorde. Derudover blev det undersøgt, hvordan algesamfund i regnvandssøer påvirkes af biocider i afstrømmet regnvand.

Rapporten peger endvidere på, at sedimentet i regnvandssøer bidrager væsentligt til en udligning af biocidkoncentrationer ved at tilbageholde biociderne under spidsbelastninger, og derpå igen frigive dem mere jævnt over en længere periode. Herved reduceres størrelsen af spidsbelastningerne med biocider til det naturlige vandmiljø, som regnvandet herefter udledes til. Der sker også en vis omsætning af biociderne i sedimentet, så der samlet sker en reduktion af biocidudledning til det naturlige vandmiljø. Alt i alt tydede undersøgelserne af alger i regnvandssøer på, at biocider i de undersøgte koncentrationer ikke førte til væsentlige ændringer i artssammensætningen. Regnvandssøer er dog påvirket af mange andre faktorer end biocider, så mulige effekter af biocider i afstrømmet regnvand kan derfor have været overskygget af andre typer af påvirkninger.



Miljøstyrelsen Strandgade 29 1401 København K

www.mst.dk