



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Pesticidfrit drikkevand

Naturlig biologisk fjernelse af pesticider i sandfiltre på vandværker

MUDP Rapport

Juni 2023

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Teknologisk Institut

Julie Bruun Jensen

Sanin Musovic

Caroline Kragelund Rickers

Grafiker: Teknologisk Institut

Fotos: Teknologisk Institut

ISBN: 978-87-7038-525-1

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. 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.	Forord	5
2.	Sammenfatning og konklusion	6
2.1	Test af bakteriers overlevelse i sandfilterkolonner i laboratorium	6
2.2	Pilotforsøg og semitekniske fuldskalaforsøg ved Herning Vand og Hjørring Vandselskab	7
2.3	Konklusion	7
3.	Summary and conclusion	8
3.1	Testing the survival of bacteria in sand filter columns at the laboratory	8
3.2	Pilot test and semi-technical full-scale tests at Danish waterworks: Herning Vand and Hjørring Vandselskab	9
3.3	Conclusion	9
4.	Formidling	10
4.1	Konferencer	10
4.2	Presse	10
4.3	Journal	10
5.	Introduktion	11
6.	Pesticidfund og pesticidnedbrydende egenskaber i sandfiltre	13
6.1	Forekomst af DMS og DPC i Danmark og EU samt stoffernes bionedbrydningspotentiale	13
6.1.1	Forekomst af DMS og DPC i Danmark	13
6.1.2	Forekomst af DMS og DPC i EU	15
6.1.3	Biologisk nedbrydning af DMS og DPC	17
6.2	Identificerede pesticidnedbrydende isolater	18
7.	Verifikation af isolaternes egnethed til nedbrydning af MCPP og BAM	19
7.1	Bioinformatisk analyse af bakterier, der nedbryder hhv. MCPP og BAM	19
7.1.1	Laboratorieforsøg med berigelse for DMS- og DPC-nedbrydende bakterier	20
8.	Etablering af proof-of-concept og optimering af bioteknologien på modelniveau	22
9.	Test af nedbrydning af MCPP og BAM i vandværker ved forsøg i pilotskala og semiteknisk fuldskala	26
9.1	Pilotskalaforsøg	27
9.1.1	Pilotskalaforsøg ved Herning Vand (MCPP)	27
9.2	Pilotskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab (MCPP og BAM)	30
9.3	Resultater fra pilotskalaforsøgene	32
9.3.1	Effekt af tilsætning af isolater	32
9.3.1.1	Fjernelse af MCPP vha. isolater under pilotskalaforsøg hos Herning Vand	32
9.3.1.2	Fjernelse af MCPP vha. isolater under pilotskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab	33

9.3.1.3	Fjernelse af BAM vha. isolater under pilotskalaforsøg hos Hjørring Vandselskab	34
9.3.2	Effekten af sandtransplantation	35
9.3.2.1	Fjernelse af MCPP vha. sandtransplantation under pilotskalaforsøg hos Herning Vand	35
9.3.2.2	Fjernelse af MCPP vha. sandtransplantation i pilotskalaforsøg hos Hjørring Vandselskab	36
9.3.2.3	Reduktion af BAM vha. sandtransplantation under pilotskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab	37
9.4	Semiteknisk fuldskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab	38
9.4.1	Resultater fra semiteknisk fuldskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab	38
9.5	Konklusion	40
10.	Referencer	41

1. Forord

Projektet *Pesticidfrit drikkevand*, der er gennemført af Teknologisk Institut i samarbejde med Herning Vand, Hjørring Vandselskab, Furesø Vandforsyning og Kemic Vandrens A/S, er støttet af Miljøteknologisk Udviklings- og Demonstrationsprogram (MUDP) under Miljøministeriet.

I nærværende rapport afrapporteres arbejdet og de resultater, der er genereret i de arbejds-pakker, der oprindeligt var opstillet i projektet.

Projektet er gennemført i perioden januar 2020 til juni 2022. Grundet Coronapandemien er projektet blevet forlænget undervejs, idet den oprindelige slutdato var december 2021.

2. Sammenfatning og konklusion

Det danske grundvand, der er den primære kilde til drikkevand, er truet af en stigende forekomst af rester af pesticider, der siver igennem jorden og således forurener grundvandsreservoirerne. Fænomenet udgør et stigende problem for danske vandværker, og det er derfor vigtigt, at der findes metoder til at reducere mængden af pesticider i drikkevand, der ledes til forbrugerne, til under den gældende grænseværdi på 0,1 µg/L (Drikkevandsdirektivet, BEK nr. 2361 af 26/11/2021).

Formålet med dette projekt var derfor at udvikle biologiske metoder til reduktion af de rester af pesticider, der desværre observeres i dansk grundvand. Naturlig forekomst af pesticidnedbrydende bakterier i naturen er påvist i flere videnskabelige studier. Hvis man kunne udnytte disse naturligt forekommende bakterier til reduktion af pesticider i sandfiltrene på danske vandværker, ville det være en nem og skånsom metode til reduktion af pesticider i drikkevandet.

Nærværende projekt, *Pesticidfrit drikkevand*, har hovedsageligt undersøgt reduktionen af pesticiderne Mechlorprop (MCP) og 2,6-dichlorbenzamid (BAM) med en tilgang baseret på tilsætning af isolater og sandtransplantation.

2.1 Test af bakteriers overlevelse i sandfilterkolonner i laboratorium

I et nu afsluttet forprojekt (Den Trojanske Hest) lykkedes det Teknologisk Institut fra frisk sand i sandfiltrene at isolere naturlige bakterier – isolater – som var i stand til at bruge flere udvalgte pesticider som kulstofkilde. Disse isolater er i dette projekt blevet kvalificeret yderligere på DNA-niveau for kendte gener, der sættes i forbindelse med nedbrydning af pesticider. De nævnte isolater er i første omgang også blevet testet i kolonneforsøg i laboratoriet under forhold, der minder om de faktiske forhold i sandfiltre på vandværker.

Der blev monitoreret for bakteriernes overlevelse både i kolonner med sand uden naturlige bakterier (rent sand) og i kolonner med frisksamlet sand fra danske vandværker med en naturlig forekomst af bakterier på sandet.

Overlevelsen af tilsatte isolater var generelt størst i sandkolonnerne med frisk sand fra drikkevandssandfiltre. Det skyldes, at overlevelseshastigheden er højere, når bakterierne findes i den biofilm på sandkornene fra sandfiltre, som de naturligt forekommende bakterier har dannet over tid. Biofilmen øger chancen for, at de tilsatte bakterier kan finde vedhæftning og dermed overleve.

Desuden viste laboratorieforsøgene, at spredning og overlevelse af de mobile, genetiske elementer (MGE), som i høj grad bærer de nedbrydende gener hos pesticidnedbrydende bakterier (inkl. isolater), udelukkende skete i kolonner med frisk sand fra eksisterende sandfiltre, hvor MGE blev spredt og fast etableret i det mikrobielle samfund på sandkornene. Tilgangen med tilsætning af isolater var således mere egnet til eksisterende sandfiltre end til opstartende sandfiltre med helt rent sand.

2.2 Pilotforsøg og semitekniske fuldskalaforsøg ved Herning Vand og Hjørring Vandselskab

I pilotskalaforsøgene blev der opsat en container med sandkolonner, først ved Herning Vand og derefter ved Hjørring Vandselskab. Ved Herning Vand blev der alene testet for MCPP-reduktion i kolonnerne med frisk sand fra egne efterfiltre tilsat en renkultur af udvalgte MCPP-reducerende isolater opdyrket i laboratoriet. Eller der blev valgt en tilgang med sandtransplantation med en direkte tilsætning i toppen af kolonnerne af 1-10 % donorsand fra Bregnerød Vandværk og Kerteminde Vandværk. De nævnte vandværker blev udvalgt på baggrund af 1) den naturlige MCPP-reduktion, der blev påvist i det omtalte forprojekt (Bregnerød) eller 2) den naturlige MCPP-reduktion, der blev observeret on-site (Kerteminde). Tilsætning af renkulturer eller sand fra udvalgte vandværker resulterede i en højere reduktion af MCPP i vandet.

Ved pilotskalaforsøgene hos Hjørring Vandselskab blev der ikke alene testet for MCPP-reduktion, men også for reduktion af BAM. Som følge af resultater fra det første vandværk (Herning) blev der i Hjørring udelukkende anvendt frisk sand fra Kerteminde Vandværk som donor ved sandtransplantation. Det samme gælder for renkulturer med udvalgte MCPP- eller BAM-reducerende isolater. Mens sandet fra Herning Vand havde en mindre reduktion i baggrunds-MCPP (som kan skyldes kemisk binding til sandkorn), viste resultaterne fra Hjørring Vandselskab fra starten en betydelig MCPP-reduktion (ca. 50 %), som over forsøgsperioden på 65 dage steg til 90 %. Reduktionen i filternes baggrunds-BAM var lav over forsøgsperioden (<2 %), men en større reduktion af BAM (op til 42 %) viste sig ved tilsætning af enten isolater eller direkte sandtransplantation.

Ved Hjørring Vandselskab blev der desuden testet for dobbelt sandtransplantation i en kolonne i semiteknisk fuldskala med tilsat 10 % sand fra kolonneforsøg ved det første vandværk (Herning), som havde 10 % frisk donorsand fra Kerteminde Vandværk tilsat sand fra Herning Vand. Dette forsøg skulle undersøge potentialet for dobbelt sandtransplantation med sand fra modnede filtre, der har fået transplanteret donorsand indeholdende MCPP-reducerende bakterier. Trods den høje reduktion af baggrunds-MCPP i kolonner med frisk sand fra Herning Vand, viste forsøg med dobbelt sandtransplantation i lighed med kolonnerne, der var tilsat 10 % sand fra Kerteminde Vandværk, en hurtigere stigning i MCPP-reduktionen end kolonnen kun med sand fra Herning Vand, hvilket indikerer, at både den almindelige sandtransplantation med sand fra Kerteminde Vandværk og den dobbelte sandtransplantation med modnet sand fra Herning Vand er effektive tilgange til et hurtigt boost af sandfilterkolonner for MCPP- og BAM-reduktion.

2.3 Konklusion

Ud fra de beskrevne, lovende resultater, hvad angår forsøg i laboratorieskala, men især forsøgene i pilotskala og semiteknisk fuldskala kan det konkluderes, at tilgangen med MCPP- og BAM-isolater samt tilgangen med enkelt og dobbelt sandtransplantation, er brugbare biologiske metoder, der vil kunne anvendes til en betydelig og stabil reduktion af MCPP og BAM i drikkevand på de danske vandværker.

De tilførte isolater med pesticidnedbrydende egenskaber blev over tid (65 dage) veletableret i sandkolonnerne, hvilket muliggjorde, at filtersand, der ikke i sig selv naturligt kunne fjerne pesticider, nu kunne bruges som sanddonor i forbindelse med sandtransplantation til det næste sandfilter. Det øger anvendeligheden for sandtransplantation mellem de enkelte vandværker.

3. Summary and conclusion

The Danish groundwater, which is the primary source of drinking water, is being threatened by the increasing occurrence of pesticide residues that seep through the ground and contaminate the groundwater reservoirs. This is a rising problem for the Danish waterworks, which requires finding methods to reduce pesticides in drinking water supplied to the consumers below the current limit value of 0.1 µg/L (Danish Drinking Water Directive (Drikkevandsdirektivet), BEK No. 2361 of 26/11/2021).

The aim of this project was to develop biological methods for reducing pesticide residues that are unfortunately detected in Danish groundwater. Natural occurrence of pesticide-degrading bacteria in nature has been demonstrated in several scientific studies. If it were possible to use these naturally occurring bacteria to reduce pesticides in sand filters at Danish waterworks, it would be an easy and gentle way of reducing pesticides in drinking water.

This project "Drinking water without pesticides" has mainly investigated the reduction of pesticides - MCPP and BAM with an approach based on the addition of isolates and sand transplantation.

3.1 Testing the survival of bacteria in sand filter columns at the laboratory

In a finalized preliminary project (The Trojan Horse), the Danish Technological Institute succeeded in isolating natural bacteria – isolates – from fresh sand in sand filters, which were able to use several selected pesticides as a carbon source. In this project, these isolates were qualified further at a DNA level for known genes associated with the breakdown of pesticides. The stated isolates have also been initially tested in column tests at a laboratory under conditions that resemble the actual conditions in sand filters at waterworks.

The survival of the bacteria was monitored both in columns with sand without natural bacteria (pure sand), and in columns with freshly collected sand from Danish waterworks with a naturally occurring bacteria on the sand.

The highest survival of added isolates was observed in sand columns with fresh sand from drinking water sand filters. This is because the survival rate is higher when the bacteria are found in the biofilm on sand grains from sand filters, which the naturally occurring bacteria have formed over time. The biofilm increases the chance that the added bacteria can attach themselves to it and thus survive.

Furthermore, the laboratory tests showed that the spread and survival of mobile, genetic elements (MGE^P), which mainly carry the degrading genes of pesticide-degrading bacteria (incl. isolates), occurred in columns with fresh sand from existing sand filters, where MGE^P was spread and firmly established in the microbial community on sand grains. The approach with the addition of isolates was thus more suitable for existing sand filters rather than new sand filters with entirely pure sand.

3.2 Pilot test and semi-technical full-scale tests at Danish waterworks: Herning Vand and Hjørring Vandselskab

At Herning Vand, only MCPP reduction was tested in columns with fresh sand from own post-filters with added pure culture of selected MCPP-reducing isolates grown at the laboratory. Or an approach with sand transplantation was chosen with direct addition of donor sand at the top of columns of 1-10 % from waterworks: Bregnerød Vandværk and Kerteminde Vandværk. The mentioned waterworks were selected based on 1) the natural MCPP reduction as shown in the above-mentioned preliminary project (Bregnerød), or 2) the natural MCPP reduction observed onsite (Kerteminde). The addition of pure sand cultures from selected waterworks resulted in a higher reduction of MCPP in the water.

In the pilot-scale tests at Hjørring Vandselskab, tests were not only carried out for MCPP reduction, but also for the reduction of BAM. Based on the results from the first waterworks (Herning), in Hjørring only fresh sand from Kerteminde Vandværk was used as a donor for the sand transplantation. The same applies to pure cultures from selected MCPP- or BAM-reducing isolates. While the sand from Herning Vand had a smaller reduction of the background MCPP (which may be due to chemical binding to sand grains), the results from Hjørring Vandselskab showed a significant MCPP reduction from the start (approx. 50%), which increased to 90% during the test period of 60 days. The reduction in the background BAM of the filters was low during the test period (<2 %), while a greater reduction of BAM (up to 42%) was observed after adding either isolates or by direct sand transplantation.

At Hjørring Vandselskab, tests were carried out for double sand transplantation in one column at semi-technical scale with added 10% sand from column tests at the first waterworks (Herning), which had 10% fresh donor sand from Kerteminde Vandværk with added sand from Herning Vand. This test was to investigate the potential of double sand transplantation with sand from the matured filters with transplanted donor sand containing MCPP-reducing bacteria.

Despite the high reduction of background MCPP in columns with fresh sand from Herning Vand, test with double sand transplantation, similar to the columns with added 10% sand from Kerteminde Vandværk, showed a faster MCPP reduction compared to the column with sand from Herning Vand only, which indicates that both the regular sand transplantation with sand from Kerteminde Vandværk and the double sand transplantation with matured sand from Herning Vand are effective approaches for a boost of sand filter columns for MCPP and BAM reduction.

3.3 Conclusion

According to the promising results from the laboratory-scale tests, but especially the pilot-scale tests and semi-technical full-scale tests, it can be concluded that the approach with MCPP and BAM isolates, as well as the approach with single and double sand transplantation, are beneficial biological methods that ensure a significant and stable reduction of MCPP and BAM in drinking water at the Danish waterworks.

The added isolates with pesticide-degrading properties became well-established in sand columns over time (60 days), which made it possible for filter sand, not able to naturally remove pesticides on its own, to be used as a sand donor in connection with sand transplantation to the next sand filter. This increases the applicability of sand transplantation between different waterworks.

4. Formidling

Projektet er undervejs formidlet ved flere konferencer og seminarer, listet nedenfor, samt via sociale media såsom LinkedIn.

4.1 Konferencer

- DK: ATV-møde. 2020: Den Trojanske Hest: Den innovative bioteknologi til rensning af pesticidrester i drikkevandssandfiltre. Præsentation
- DK: Danish Water Forum. Copenhagen. 2020. The Trojan Horse - A new biotechnology for pesticide removal at drinking water sand. Præsentation
- DK: Danish Water Forum. Copenhagen. 2022: Novel biotechnology for pesticide removal at drinking water sand filters. Præsentation
- DK: IWA World Water Congress & Exhibition, København. 2022. A new biotechnology for pesticide removal at drinking water sand filters. Præsentation.

4.2 Presse

- DK: Pressemeddelelse.dk. 2022: Ny bioteknologi skal bekæmpe forurenede drikkevand med vandværkets bakterier
- DK: Energy Supply. 2020: Donorsand sendes ind i kampen mod pesticider
- DK: LederiDag: 2020. Donorsand sendes ind i kampen mod pesticider.

4.3 Journal

- International. mBio - ASM Journals - *American Society for Microbiology* 2021. Broad Dissemination of Plasmids across Groundwater-Fed Rapid Sand Filter Microbiomes." *mBio* vol. 12,6 (2021): e0306821. doi:10.1128/mBio.03068-21.

5. Introduktion

I Danmark og i mange andre EU-lande anvender vandværkerne traditionel sandfiltrering til produktion af drikkevand fra grundvand. Alene i Danmark er der over 2.200 vandværker med over 12.000 sandfiltre, hvor de naturlige forureninger i grundvandet (NH_4 , Mn, Fe osv.) fjernes effektivt via en kombination af mikrobiologiske og kemiske processer, hvorefter rent drikkevand leveres til forbrugerne. Den stigende forekomst af nye, unaturlige forureningsstoffer i grundvandet, nemlig pesticider, og de eksisterende sandfiltres manglende evne til at fjerne disse pesticider fra grundvandet, udfordrer den fremtidige forsyning af rent og sikkert drikkevand til forbrugere i Danmark og i resten af verden. De pesticider, der findes i grundvandet, tilhører hovedsageligt generationen af de nu forbudte pesticider. Det faktum, at der fortsat anvendes nye pesticider i landbruget (11.507 ton/år i DK i 2018 (Miljøstyrelsen, 2018)) betyder, at problematikken med pesticidforurening af grundvandet må forventes at strække sig mange år ud i fremtiden.

Over det seneste årti er mikrobiologien i sandfiltre blevet undersøgt grundigere. Der er blevet vist, at sandfiltre på de danske vandværker er rige på bakterier (ca. en milliard bakterier per gram). Disse talrige bakterier bærer naturligt på en række metaboliske egenskaber og kan effektivt fjerne naturlige forureninger i grundvandet. De naturlige bakterier i sandfiltrene har imidlertid kun ringe kapacitet for nedbrydning af pesticider, især når det gælder de mest problematiske pesticider. Flere nyere, nationale projekter (f.eks. projekterne Mem2Bio og Den Trojanske Hest, 2016-2019) har arbejdet på at identificere og udnytte de store mikrobiologiske ressourcer i sandfiltre til at fjerne pesticider direkte i sandfiltrene på vandværkerne. Sidstnævnte projekt har identificeret enkelte sandfiltre, hvori evnen til naturlig nedbrydning af visse pesticider kunne påvises, og hvorfra det lykkedes at isolere pesticidnedbrydende bakterier. De lovende resultater og tilhørende renkulturer danner således et stærkt fundament for nærværende projekt.

Formålet med nærværende projekt var at udvikle en bæredygtig, biologisk sandfilterteknologi til håndtering af de stigende forekomster af pesticider i drikkevandet. Fokus i projektet var på fjernelse af pesticider i sandfiltrene ved brug af bakterier, som naturligt bærer på et pesticidnedbrydende gen.

Flere studier har over de seneste 20 år vist, at forsøg på at isolere bestemte bakterier fra et miljø og introducere dem i et andet miljø, så de kunne fjerne et uønsket stof (såkaldt bioremediation) desværre ikke lykkedes. For eksempel overlevede de tilførte bakterier kun kort tid (maks. et par uger), og/eller de blev vasket ud fra de sandfilterkolonner, de var introduceret i forholdsvis hurtigt (ref. Mem2Bio). Derfor er der i nærværende projekt valgt en helt ny tilgang.

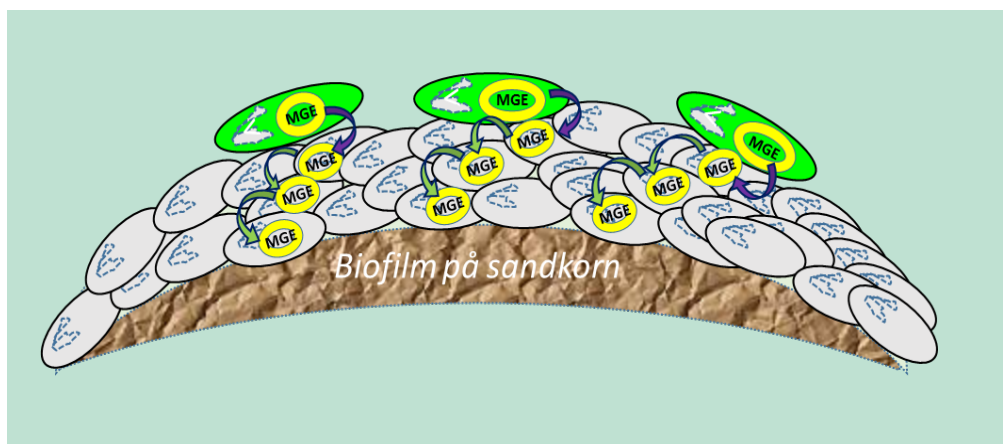
Mange pesticidnedbrydende bakterier bærer evnen til pesticidnedbrydning vha. såkaldte mobile, genetiske elementer (MGE). I dette tilfælde sidder genet til pesticidnedbrydning på et MGE, som de enkelte bakterier kan videregive til omkringliggende bakterier ved horisontal genoverførsel. Det er desuden normalt, at en kopi af MGE ved bakteriel celledeling vil blive beholdt i hver af de kommende to celler.

Derfor var projektets fokus primært på at anvende isolater, dvs. bakterier, som bærer den pesticidnedbrydende evne via MGE. Efter tilførsel til f.eks. et sandfilter, vil isolatet over de første par dage eller uger have mulighed for at overføre MGE til de naturlige forekomne bakterier på sandet i filtrene. Skulle de tilførte isolater blive vasket ud, vil den pesticidnedbrydende evne være sikret overlevelse i de naturlige bakterier i sandfiltrene og sprede sig internt enten ved horisontal genoverførsel eller ved celledeling (FIGUR 1).

Der var i projektet fokus på mikrobiologisk fjernelse af to af de oftest forekommende pesticider i dansk grundvand, MCCP og BAM vha. isolater med tilhørende MGE. Der er altså ikke tale om at manipulere eller genetisk modificere bakterier, men derimod at finde og isolere naturlige bakterier og udnytte disse til at reducere bestemte pesticider i sandfiltrene.

I projektet blev der arbejdet med to fremgangsmåder til overførsel af pesticidnedbrydende bakterier til et udvalgt sandfilter for at tilføre filtret en evne til mikrobiel pesticidnedbrydning:

- 1) Sandtransplantation med frisk sand fra sandfiltre med påvist pesticidnedbrydende evner til sandfiltre uden pesticidnedbrydende evne.
- 2) Direkte tilsætning af isolater til sandfiltre. Dvs. bakterier der bærer MGE, og som er i stand til at videregive MGE til de allerede forekommende, ikke-pesticidnedbrydende bakterier i filtret, opdyrkes i laboratoriet og tilsættes herefter til sandfiltrene.



FIGUR 1. Tilsætning af isolater. De naturlige isolater (grønne) er bærere af evnen til pesticidnedbrydning via MGE (gule). Efter introduktion af isolater til sandfiltre vil MGE blive overført til eksisterende bakterier i sandfiltrene (grå). Herfra vil kopier af MGE blive serieoverført til andre bakterier i biofilmen.

For udvikling og afprøvning af bioteknologien til pilotskala (TRL-niveau 7) gennemføres i projektet følgende aktiviteter:

- Karakterisering af danske sandfiltres evne til biologisk nedbrydning af pesticiderne MCCP og BAM. Hertil inddrages og videre karakteriseres på DNA-niveau de eksisterende isolater fra forprojektet, Den Trojanske Hest.
- Laboratorieforsøg med isolering af bakterier til de nyere fundne pesticider N,N-dimethylsulfamid (DMS) og desphenyl-chloridazon (DPC).
- Laboratorieforsøg med modelbakterier, som bærer en pesticidnedbrydende evne på et sporbart MGE, og observation af elementets overlevelse under sandfilterlignende forhold.
- Opstilling og løbende tilpasning af pilotskalaforsøg på vandværker, som er direkte påvirket af pesticidfund i deres grundvand. Formålet er at analysere effekten af sandfiltrenes pesticidnedbrydende evne efter hhv. sandtransplantation og tilsætning af isolater til vandværkenes sandfiltre.
- Teste potentialet for dobbelt sandtransplantation i sandfilter i semiteknisk skala på partner-vandværk.

6. Pesticidfund og pesticidnedbrydende egenskaber i sandfiltre

Projektet læner sig op ad den nyeste, videnskabelige litteratur omhandlende bioremediering i naturlige miljøer med fokus på de pesticider, som er påvist direkte i det danske grundvand. Endvidere fokusere dette projekt på andre nyere, nationale projekter om bl.a. sandfiltres mikrobiologi (DW Biofilters 2010-2015) og pesticidnedbrydning i sandfiltre (Mem2Bio, Den Trojanske Hest 2016-2019) samt på relevante internationale studier (Ref 1, 2, f.eks. Wet et al.). Kortlægningen af tilgængelige data om nyere pesticidfund i grundvandet i Danmark og EU (f.eks. DMS og DPC) inddrages i projektet for at sikre en bredere anvendelighed af den i projektet udviklende, bioteknologiske tilgang til pesticidproblematikken.

I forprojektet, Den Trojanske Hest (2016-2019), blev der identificeret danske sandfiltre, der indeholder bakterier med en naturlig, biologisk evne til pesticidnedbrydning. Disse sandfiltre blev anvendt til berigelse og isolering af en række pesticidnedbrydende bakterier for bl.a. MCPP, BAM, MCPA og glyphosat, hvoraf de førstnævnte skulle viderekarakteriseres med henblik på anvendes i nærværende projekt.

6.1 Forekomst af DMS og DPC i Danmark og EU samt stoffernes bionedbrydningspotentiale

6.1.1 Forekomst af DMS og DPC i Danmark

Pesticidet N,N-dimethylsulfamid (DMS) stammer fra et af de to stoffer tolylfluorid eller dichlofluorid, der begge har været anvendt som svampemiddel i Danmark helt op til 2007. Begge stoffer har dog været anvendt i maling og træbeskyttelse efter 2007, bl.a. til beskyttelse af træ mod skimmelsvamp. I 2019 blev det helt forbudt at bruge stoffet dichlofluorid i maling.

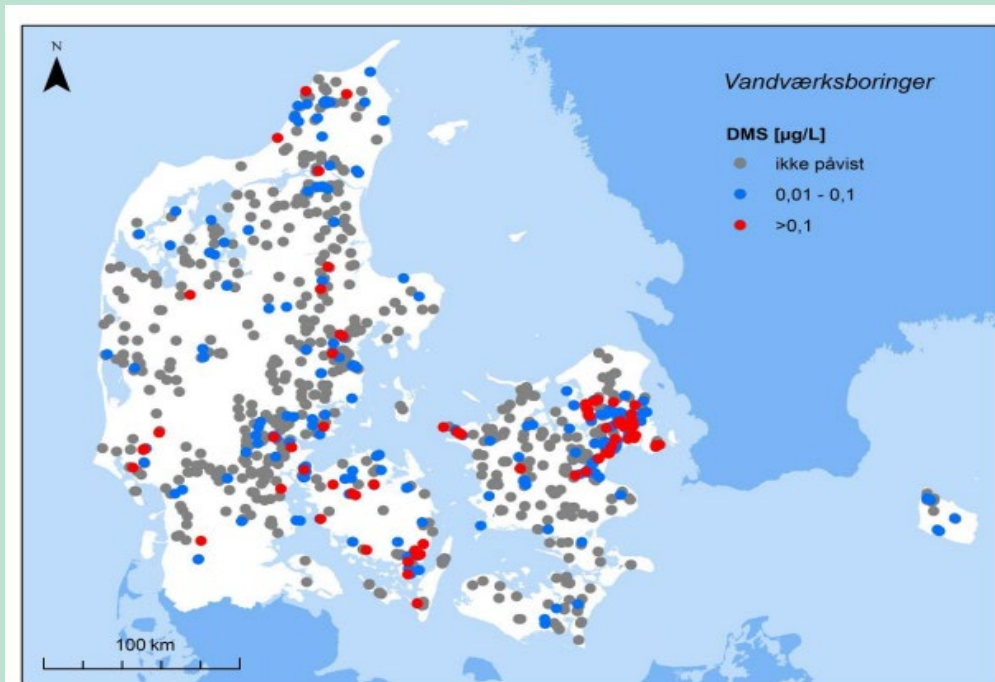
Pr. 1 juli 2018 blev DMS opført på listen over de stoffer, der i forbindelse med en boringskontrol skal undersøges i det obligatoriske analyseprogram for pesticider og nedbrydningsprodukter heraf. Nogle af de første analyseresultater blev præsenteret i en rapport om grundvandsovervågning fra GEUS, 2019. DMS blev fundet i 481 af de i alt 1.565 undersøgte grundvandsboringer (30,7 %), hvoraf en DMS-koncentrationen $>0,1 \mu\text{g/L}$ (grænseværdi for drikkevand) blev konstateret i 128 (8,2 %).

I et opfølgende program for overvågning af grundvand (GEUS 2020) blev DMS påvist som det hyppigst fundne pesticid i vandforsyningernes boringer, med fund i 32,8 % af de undersøgte boringer. I 8,8 % af disse oversteg DMS-koncentrationen grænseværdien ift. kvalitetskravet. Hvad angår undersøgelsen af DMS-forekomst i de grundvandsindtag, som indgår i det nationale system til grundvandsovervågning (GRUMO), blev DMS påvist i 29,8 % af de undersøgte grundvandsindtag.

Disse fund viser, at DMS p.t. er det hyppigst fundne pesticid i dansk grundvand, hvilket gør det yderst relevant at kunne fjerne det effektivt fra det grundvand, der anvendes til drikkevandsproduktion på vandværkerne.

Geografisk forekomst af DMS i vandforsyningernes boringer i Danmark er præsenteret i FI-GUR 2. Det fremgår, at DMS-koncentrationer $>0,1 \mu\text{g/L}$ ofte ses i hovedstadsområdet. Dette

kunne skyldes det højere forbrug af maling og træbeskyttelse med fundet af stofferne tolylfluonid og dichlofluonid i området, omend fænomenet ikke observeres i andre større byer såsom Aarhus og Odense. Geologisk set kunne DMS påvises i grundvandet helt ned til 109 meters dybde. De største forekomster er dog forsat mest synlige i de øvre jordlag (0-50 m).

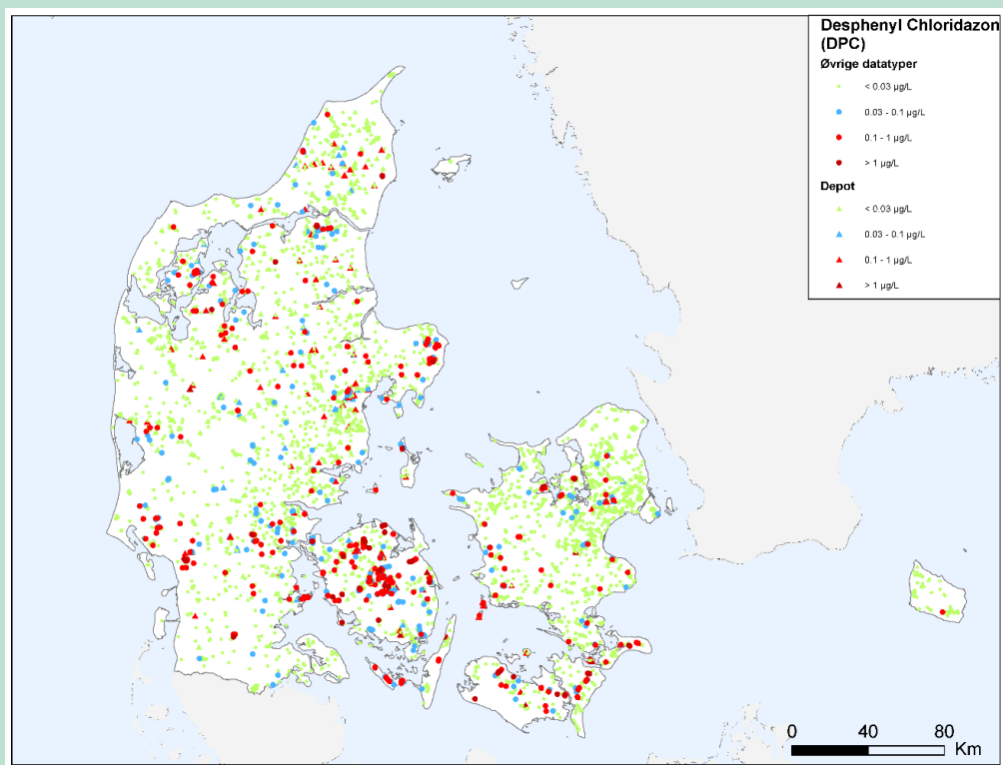


FIGUR 2. Geografisk forekomst af DMS i Danmark i gængse vandværkers indvindingsboringer. Boringerne er i figuren opdelt i tre intervaller for koncentrationen af DMS: Grå: ikke påvist (under detektionsgrænsen, typisk $<0,01 \mu\text{g/L}$); Blå: påvist mindst én gang under grænseværdien ($0,01\text{-}0,1 \mu\text{g/L}$); Rød: påvist mindst én gang over grænseværdien ($>0,1 \mu\text{g/L}$).

Desphenyl-chloridazon (DPC) er et nedbrydningsprodukt, der stammer fra det nu forbudte herbicid chloridazon, som i udbredt grad blev anvendt i Danmark til ukrudtsbekæmpelse ved dyrkning af bl.a. sukkerroer. Chloridazon var mest udbredt i perioden 1970-1980, men i 1996 blev godkendelsen af stoffet trukket tilbage, og siden 2012 har anvendelse af stoffet været totalt forbudt. En rapport fra GEUS i 2018 viste, at der blev fundet DPC i 23 % af de undersøgte grundvandsboringer, og dermed udgør førnævnte DMS og DPC to af de tre hyppigst fundne pesticider i dansk grundvand.

De nyeste undersøgelser af grundvandet viser, at DPC blev fundet i 31,5 % af de undersøgte grundvandsindtag, hvoraf 16,8 % indeholdt DPC i en koncentration, der overstiger grænseværdien på $0,1 \mu\text{g/L}$ (Thorling L. A., 2021). I de grundvandsboringer, som er direkte tilknyttet vandforsyningerne, blev DPC påvist i 25,5 % og i 6,9 % heraf i koncentrationer over grænseværdien. NIRAS har i 2017-2018 foretaget en landsdækkende undersøgelse på ledningsført vand (drikkevand) fra 545 danske vandværker, og DPC blev målt i drikkevand fra 127 vandværker.

DMS og DPC er således fortsat de hyppigst forekommende pesticider i dansk grundvand. Geografisk forekomst af DPC i Danmark er præsenteret på FIGUR 3. Som det fremgår af figuren, ses DPC-koncentrationer $>0,1 \mu\text{g/L}$ hovedsageligt på Fyn.



FIGUR 3. Geografisk forekomst af DPC i Danmark i gængse vandværkers indvindingsboringer. Boringerne er i figuren opdelt i tre intervaller for koncentrationen af DPC: Grøn: ikke er påvist (under detektionsgrænsen, typisk <0,01 µg/l); Blå: påvist mindst én gang under grænseværdien (0,01-0,1 µg/l); Rød: mindst én gang over grænseværdien (>0,1 µg/l).

6.1.2 Forekomst af DMS og DPC i EU

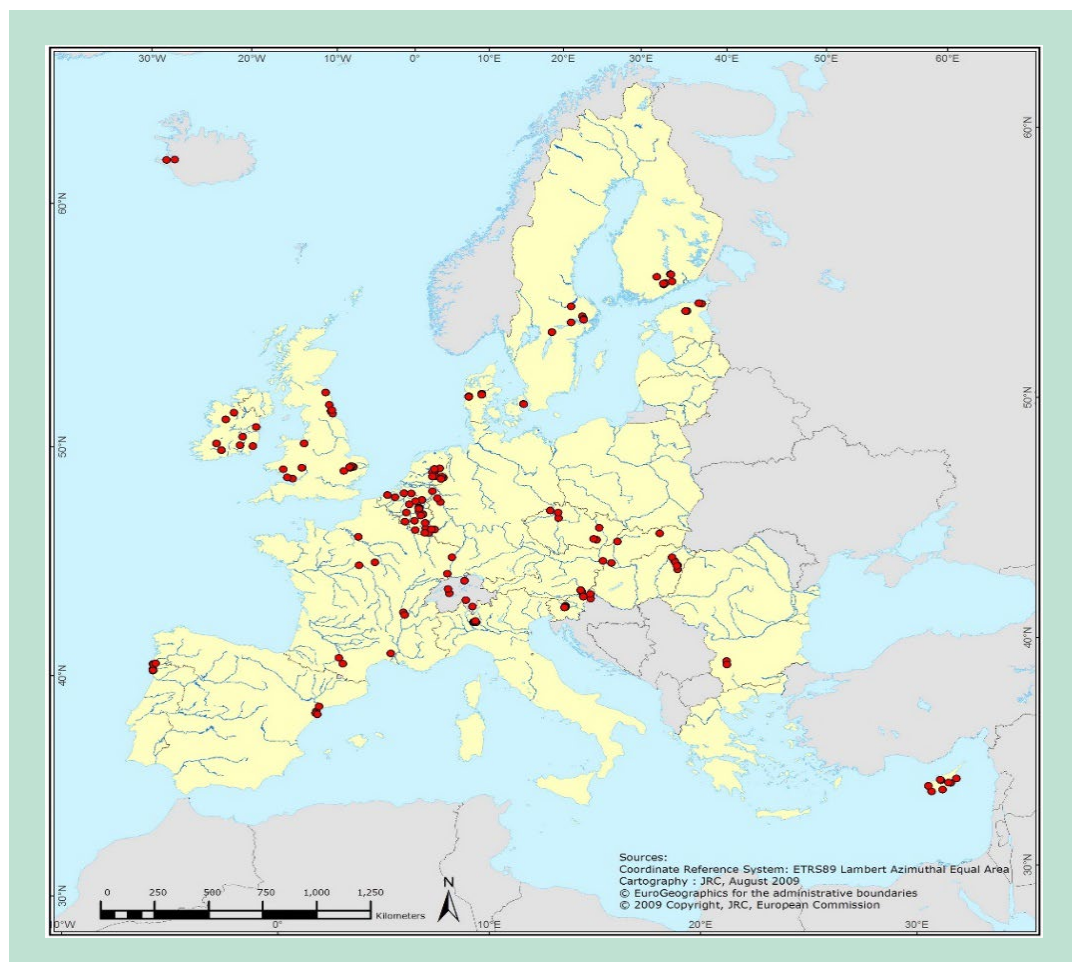
Forekomst af pesticiderne DMS og DPC i drikkevand er en global udfordring. De øvrige EU-lande har i samme eller i endnu større grad benyttet sig af pesticider såsom tolylfluamid og chloridazon til hhv. svampe- og ukrudtsbekæmpelse. Udfordringen kan være lidt større i EU-lande, hvor man på vandværkerne delvis bruger overfladevand og/eller benytter sig af UV-behandling/ozonering af grundvandet.

Man har i Tyskland fundet DMS i grund- og overfladevand (søer) med typiske koncentrationer på 0,05-1 µg/L (Schmidt & Brauch, 2008). Et andet studie omhandlende det tyske grund- og overfladevand viste, at DMS blev påvist i 65 % af 600 udtagne vandprøver med koncentrationer helt op til 63 µg/L (Kowal, Balsaa, Werres, & Schmidt, 2009). I lande som Tyskland ligger den store udfordring især i det faktum, at DMS i vandet ved den praktiserede ozonering af grundvandet på de tyske vandværker kan frembringe et kræftfremkaldende stof (NDMA), som udgør et endnu større problem end DMS. Et studie af Schmidt et al. (2008) viste, at 30-50 % af DMS omdannes til NDMA ved ozonering af DMS i vandet.

Forekomsten af DMS i overfladevand er også betydelig i mange andre EU-lande. F.eks. har et studie foretaget af Norwegian Climate and Pollution Agency (KLIF) undersøgt overfladevand fra to store norske søer, Østensjø og Holmendammen, hvor der var betydelige fund af DMS i koncentrationer over grænseværdien på hhv. 0,45-0,77 µg/L i Østensjø og 0,10-0,54 µg/L i Holmendammen.

Et bredere studie af grundvandet for forekomst af pesticider og pesticidnedbrydende produkter blev foretaget i 23 EU-lande (Loos, et al., 2010). FIGUR 4 viser, at DMS var et af de pesti-

der, som hyppigst blev fundet i koncentrationer, der overstiger grænseværdien ift. kvalitetskra-
vet til europæisk grundvand på 0,1 µg/L (Den Europæiske Unions Tidende, 2020). I dette stu-
die oversteg DMS grænseværdien i 8 af de 23 undersøgte vandprøver med den højeste DMS-
koncentration på 55 µg/L og en gennemsnitskoncentration på 0,332 µg/L.



FIGUR 4. Forekomst af DMS i EU-lande (Loos, et al., 2010).

Flere EU-lande har, ud over DMS, registreret betydelige fund af stoffet DPC i grund- og over-
fladevand. Man har f.eks. i region Hesse i Tyskland allerede i 2007, som en del af en omfat-
tende kampagne vedr. chloridazon og nedbrydningsproduktet DPC, opsamlet 548 prøver af
grund, overflade- og spildevand. Blandt de undersøgte prøver på overfladevand blev chlorida-
zon detekteret i små koncentrationer - gennemsnitlig koncentration på 0,06 µg/L og den høje-
ste måling på 0,89 µg/L. Målekampagnen viste, at chloridazon forekom hyppigst i det nordlige
af Hesseregionen med intensivt landbrug. Disse måleresultater var forventelige, idet chlorida-
zon hurtigt omdannes mikrobiologisk til DPC, hvorfor en eventuel forekomst af en efterføl-
gende biologisk nedbrydning af DPC kan diskuteres.

Et studie af grundvand i det sydlige Tyskland (Baden-Württemberg og Bavaria) viste, at 42 %
af de udtagne vandprøver indeholdt en DPC-koncentration >1 µg/L, mens 44 % viste en DPC-
koncentration på 0,11-1 µg/L (Buttiglieri, et al., 2009). Studiet viste, at en anden mulig chlori-
dazon-metabolit, methyl-desphenyl-chloridazon (Me-DPC), var til stede i 45 % af prøvetag-
ningsstederne med DPC målt til 0,11-1 µg/L. Forekomst af DPC i grund- og overfladevand er
desværre rapporteret i de fleste af de EU-lande, som har foretaget målrettede målekampagner
(Kiefer, et al., 2020).

6.1.3 Biologisk nedbrydning af DMS og DPC

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

En anden gruppe af bakterier i sandfiltrene, ammoniumoxiderende bakterier (AOB), oxiderer ammonium i sandfiltret vha. enzymet ammoniummonooxygenase (amoA), der ligesom metanmonooxygenase uspecifikt kan omsætte andre forbindelser, f.eks. pesticidet 1,2,4-triazole (Wu, et al., 2016). AmoA-enzymet blev dog ikke identificeret som værende betydende ift. co-metabolsk oxidation af bentazon (Hedegaard, et al., 2020). Enzymerne pmoA og amoA er trods deres forskellige funktioner i hhv. MOB og AOB strukturelt og evolutionært tæt beslægtede (Erwin, et al., 2005), hvilket forklarer det fælles træk uspecifikt at kunne nedbryde forskellige stoffer (co-metabolsk). Fra tidligere projekter om lægemiddelfjernelse fra spildevand kendes AOB's evne til co-metabolsk nedbrydning, da fjernelsen af visse lægemidler var direkte korreleret med en høj fjernelsesgrad for ammonium (Tang, et al., 2017; Xu, Chen, Yuan, & Ni, 2018).

Initiale forsøg i laboratorieskala med pesticiderne MCPP, DMS og DPC viste en potentiel biologisk nedbrydning af DMS og DPC på hhv. 35 % og 23 % (foredrag Dansk Vand Konference 12. nov. 2019). Mikrobiel nedbrydning af DMS er dog endnu ikke publiceret i videnskabelige artikler, hvilket indikerer, at muligheden for, at der findes bakterier, der kan nedbryde DMS er meget lille eller ikke-eksisterende.

I Tyskland har man som en del af den førnævnte kampagne i region Hesse (2007) undersøgt den aerobe nedbrydning af chloridazon (moderstof til DPC) i bioreaktorer i laboratorieskala. Det blev påvist, at moderstoffet chloridazon var biologisk fuldstændig omdannet til pesticidet DPC. Forsøget med bioreaktoren varede i ca. 100 dage og viste, at DPC desværre var resistent overfor videre nedbrydning, hvilket igen forklarer den længerevarende stabilitet og det højere fund af DPC i miljøet end af moderstoffet chloridazon.

Det gælder for DPC som for DMS, at der mangler pålidelige videnskabelige publikationer om stoffets biologiske nedbrydningspotentiale. Et studie omhandlende DPC i overfladevand i Schweiz (Kiefer, et al., 2020) antydede, at det fundne DPC kunne være det endelige nedbrydningsprodukt, som ikke kan nedbrydes til mindre komponenter.

Trods flere forsøg i laboratorium, hvor det blev forsøgt at berige for DMS- og DPC-nedbrydende bakterier fra flere sandfiltre, lykkedes det ikke at få isoleret bakterier til videre arbejde (7.1.1). Dette kunne igen tyde på, at de rester, der findes af både DMS og DPC kunne være de endelige nedbrydningsprodukter, som bakterierne ikke kan nedbryde yderligere.

6.2 Identificerede pesticidnedbrydende isolater

I forbindelse med forprojektet, Den Trojanske Hest, blev der opsat forsøg med C¹⁴-markerede pesticider og frisk sand med naturligt forekommende bakterier. Forsøgene påviste, hvilke sandfiltre der indeholdt bakterier, der kunne reducere C¹⁴-markerede pesticider hele vejen til C¹⁴-markeret CO₂. De bedste sandfiltre fra forprojektet blev udvalgt til sandtransplantation i nærværende projekt. Desuden blev frisk sand fra nogle af de testede sandfiltre anvendt ved forsøg i laboratoriet målrettet selektivt isolering af pesticidnedbrydende bakterier. Fokus var særligt på de bakterier, der bærer en evne til nedbrydning af pesticider på MGE. Et vellykket forsøg ville styrke den innovative del af den udviklende bioteknologi med mulighed for, at de pesticidnedbrydende evner ville kunne overføres til andre, naturligt forekommende bakterier i sandfiltre (se FIGUR 1).

Til forsøgene blev der i starten af forprojektet initieret flaskeforsøg, hvortil der blev anvendt frisk sand og vand med de nødvendige salte og sporstoffer fra sandfiltre og derudover et bestemt pesticid (hhv. MCPP, BAM, osv.) som eneste kulstofkilde. Det lykkedes i forprojektet at isolere flere pesticidnedbrydende bakterier, som ad flere omgange kunne vokse i både flydende og fast medie med det tilsatte pesticid som eneste tilgængelige kulstofkilde.

I alt blev der i nærværende projekt isoleret og verificeret 25 MCPP-nedbrydende bakterier og 9 BAM-nedbrydende bakterier, hvoraf det blev valgt at arbejde med 5 MCPP-nedbrydende bakterier og 5 BAM-nedbrydende bakterier. Udvælgelsen var baseret på det molekylærbiologiske arbejde, hvor man ved flere selektive dyrkninger bl.a. undersøgte a) forekomst af MGE med specielle DNA-kits, som udelukkende isolerer MGE fra bakterieceller, samt b) molekylære PCR-analyser på visse kendte pesticidnedbrydende gener såsom bbdA og bbdF for BAM, og tfaA for MCPP. Af BAM-isolaterne blev BAM1st, BAM3st, BAM3fl, BAM5st og BAM7st udvalgt til videre arbejde. Af MCPP-isolaterne blev MCPP4, MCPP6, MCPP9, MCPP14 og MCPP14 udvalgt til videre arbejde. Den nøjagtige udvælgelsesproces og resultater af de molekylære analyser er vist i afsnit 7.

7. Verifikation af isolaternes egnethed til nedbrydning af MCPP og BAM

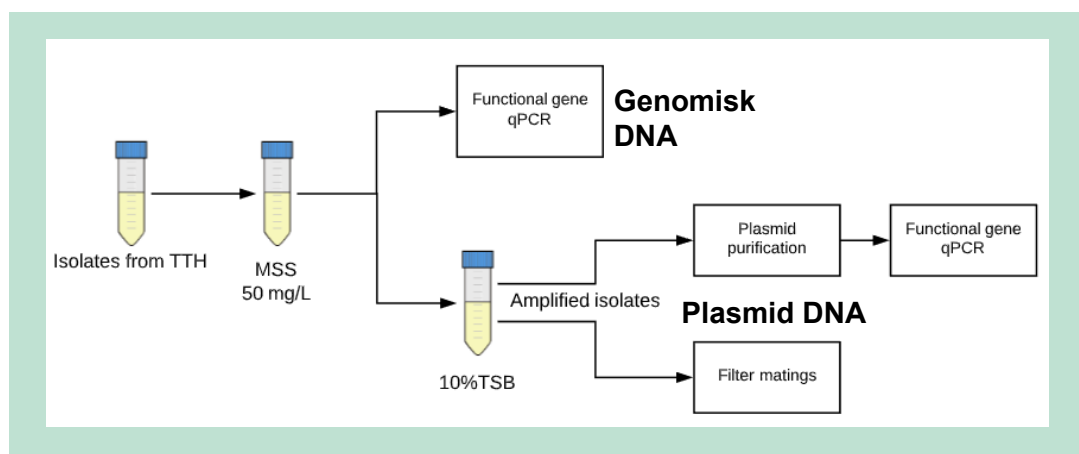
I nærværende projekt var fokus på at verificere bakteriers evne til nedbrydning af pesticider som beskrevet ovenfor. Der var ligeledes fokus på ved flaskeforsøg at forsøge at booste bakteriers effektivitet mht. nedbrydning af en nyere generation af pesticider, hhv. DMS og DPC.

De eksisterende bakterier for nedbrydning af MCPP (25) og BAM (9) blev udsat for yderligere verifikation. Der blev således foretaget molekylær og bioinformatisk analyse af bakterierne for at verificere, at nedbrydningsevnen primært ligger på MGE og dermed kan overføres.

7.1 Bioinformatisk analyse af bakterier, der nedbryder hhv. MCPP og BAM

De ovenfor beskrevne bakterier er blevet undersøgt for tilstedeværelsen af bestemte gener, som ifølge flere videnskabelige studier ville kunne nedbryde hhv. MCPP og BAM. Alle de isolerede bakterier blev opdyrket i minimal medie (MSS) med kontrolbar N,C,P-kilde, hvor C-kilden var et bestemt pesticid. Der blev undersøgt for a) tilstedeværelse af det pesticidnedbrydende gen i cellen, b) tilstedeværelse af et MGE vha. en selektiv isolation af MGE-DNA og c) tilstedeværelse af det pesticidnedbrydende gen på det ekstraherede MGE-DNA (FIGUR 5).

De traditionelle PCA- og PCR-assays målrettet identifikation af de kendte gener for nedbrydning af hhv. MCPP (tfdA) og BAM (bbdA) blev anvendt på de respektive isolater, se FIGUR 5.



FIGUR 5. Isolater dyrket i Minimal media (MSS) med pesticid som eneste C-kilde bruges til kvantitativ a) qPCR analyse på kendte gener der står for nedbrydning af hhv. MCPP (tfdA) og BAM (bbdA), b) undersøge tilstedeværelse af plasmid i isolatet, via en direkte plasmidisolations forsøg med laboratoriske kits eller filter-matings forsøg der til formål har at overføre plasmidet til et andet laboratorisk bakteriel stamme (ref. recipient).

Denne screening viste, at det var muligt at verificere en MGE-båren evne til nedbrydning af pesticider (BAM og MCPP) hos en stor del af bakterierne. Dermed kunne de observerede nedbrydningsegenskaber tilskrives hhv. tfdA- og bbdA-generne, som fandtes på disse MGE.

TABEL 1. Oversigt over BAM-isolater, som viste tilstedeværelse af en af de kendte BAM-nedbrydende gener (ref.: bbdA og bbdF).

Brøndnavn	Isolatnavn	Primer 1 (bbdA)	Primer 2 (bbdF)
C1	Δ3 st (BAM)	+	÷
D1	Δ3 fl (BAM)	+	÷
G1	Δ7 st (BAM)	+	÷
F1	Δ5 st (BAM)	+	÷
A1	Δ1 st (BAM)	+	÷

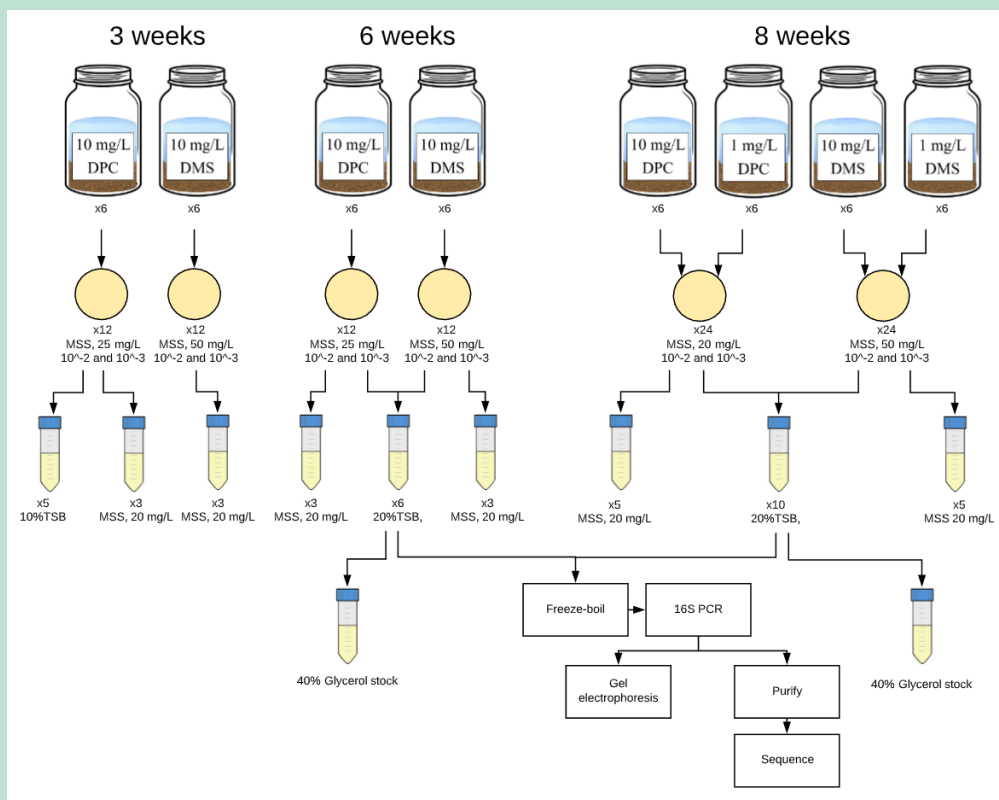
Alle MCPP- og BAM-isolater blev sekvenseret (16S DNA-niveau) for at bestemme, hvilke mikrobielle grupper de tilhører. De fleste MCPP-isolater var tættest beslægtet med gruppen af *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas sp* og *Chryseobacterium indologenes*, mens de fleste BAM-isolater var tættest beslægtet med bakterier fra *Pseudomonas sp*, *Chryseobacterium indologenes* og *Flavobacterium sp*-gruppen.

Den endelige udvælgelse af pesticidnedbrydende bakterier var baseret på følgende kriterier: 1) at bakterierne var bærere af et af de relevante pesticidnedbrydende gener, tfdA eller bbdA, og at disse gener var på et påvist MGE; 2) at bakterierne så vidt muligt tilhørte forskellige mikrobielle grupper; samt 3) at bakterierne var lette at dyrke i laboratorium, da et betydeligt volumen var nødvendigt til udførelse af pilotskalaforsøg.

7.1.1 Laboratorieforsøg med berigelse for DMS- og DPC-nedbrydende bakterier

I laboratoriet blev der opstillet en række flaskeforsøg med det formål at isolere og berige bakterier til isolater målrettet de nyere fundne pesticidrester i drikkevand, DMS og DPC. Formålet var at sikre, at teknologikonceptet fortsat ville kunne videreudvikles, så det også i fremtiden kunne anvendes til eventuelt kommende fund af nye pesticidrester.

For at fremme berigelsen af relevante pesticidnedbrydende bakterier i laboratorieforsøg blev følgende fremgangsmåde anvendt: Flasker tilsat minimal medie med enten DMS eller DPC som eneste kulstofkilde blev inkuberet over 3 måneder. Der blev tilsat 2 forskellige koncentrationer af DMS og DPC (1 mg/L og 10 mg/L) som vist i FIGUR 6. Berigelses-, isolerings- og verificeringsplan for renkultur var udarbejdet og bestod bl.a. af periodisk (14-dags) udpladning på fast medie og i flydende minimal medie. Det var desværre ikke muligt at frembringe vækst af de bakterier, der var specialiseret i nedbrydning af DMS og DPC, på trods af talrige, gentagne forsøg.



FIGUR 6. Laboratorieopstilling af flaskeforsøg til berigelser af bakterier for specialisering i nedbrydning af hhv. DMS og DPC. Små flasker tilsat minimalt medie med enten DMS eller DPC (hhv. 1 mg/L eller 10 mg/L) og frisk sand fra udvalgte sandfiltre inkuberes. Der laves periodisk (14-dags) udpladning fra hver flaske på solidt vækstmedie (agarplader), og evt. voksende kolonier på pladerne overføres til et rør med flydende minimalt medie.

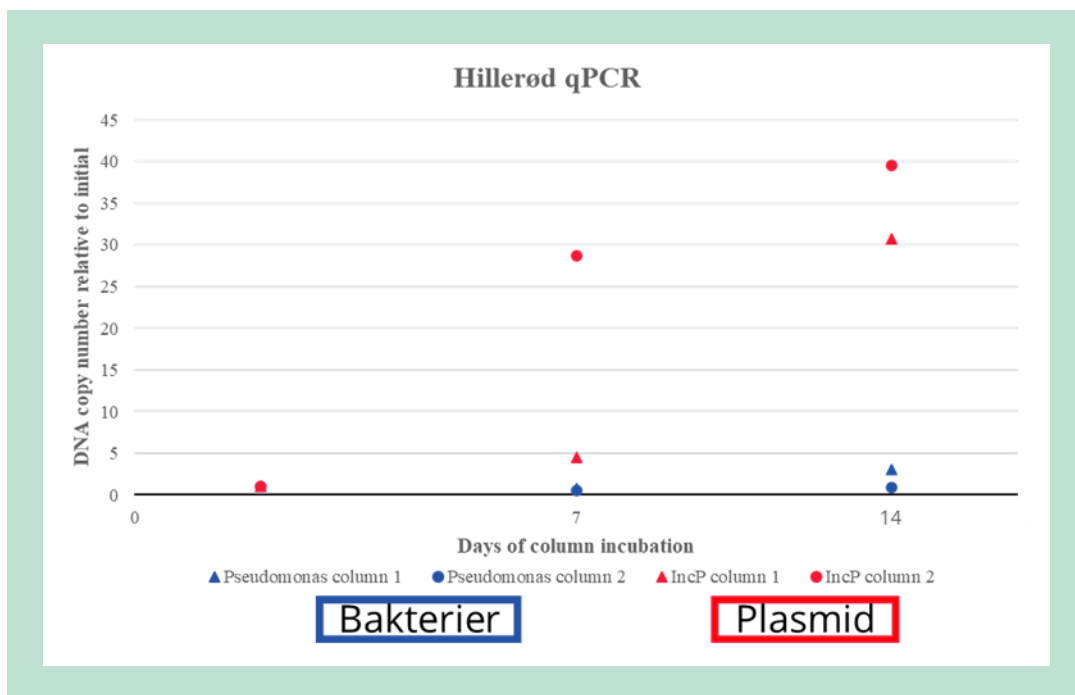
8. Etablering af proof-of-concept og optimering af bioteknologien på modelniveau

For at kunne verificere det bioteknologiske koncept med spredning af et gen for nedbrydning af pesticider til andre naturligt forekommende bakterier i sandfiltrene var det nødvendigt at dokumentere spredningen af MGE og at optimere de forhold, som evt. ville kunne øge denne spredning. Den første proof-of-concept for spredning af et model-MGE fra en modelbakterie tilført det naturlige mikrobielle samfund i sandfiltre, er blevet påvist i forprojektet under optimale laboratorieforhold. Her blev fire MGE'er (RP4, RSF1010, pKJK5 og TOL) anvendt, og forsøg viste, at spredning er mulig under laboratorieforhold (på fast medie, ved rumtemperatur m.m.), til de naturlige Alpha-, Beta- og Gammaproteobacteria (Pinilla-Redondo, et al., 2021). Spredning af RP4 under mere virkelighedsnære forhold, dvs. forhold som findes i sandfiltrene (flow, lav temperatur (8° C) osv.), skulle undersøges i nærværende projekt.

Fokus i dette projekt var således at undersøge: 1) overlevelsen af de introducerede bakterier, 2) spredningen af MGE fra de introducerede bakterier til sandfilterbakterier samt 3) muligheden for positivt at stimulere MGE-spredning, f.eks. med tilsætning af udvalgte sporstoffer eller lignende tiltag. Optimeringsforsøgene skulle danne basis for det endelige design af pilotskala-forsøgene.

Til formålet blev kolonneforsøg med frisk, levende sand fra to vandværker opstillet i laboratoriet under konstant temperatur (8° C) og flow (hanevand). Forsøget skulle vise, om det introducerede RP4 i en bakteriestamme *Pseudomonas putida* kunne overføres til de bakterier, der naturligt forekommer i sandfiltre.

Overlevelse af *Pseudomonas putida* samt spredning og langsigtet etablering af det introducerede RP4 i kolonnerne blev selektivt monitoreret ved hjælp af molekylær qPCR-analyse på gener, der er specifikke for *Pseudomonas* og for modelplasmidet RP4. Resultaterne viste, at man især i sandkolonner med frisk sand fra Hillerød Forsyning kunne konstatere et fortsat konstant niveau af det tilsatte *Pseudomonas putida* efter 14 dage, mens mængden af det tilsatte RP4 steg betydeligt i løbet af samme periode. Mængden af RP4 (bestemt ved qPCR-analyse som antal af RP4-kopier) steg 40 gange over 14 dage i forhold til det oprindelige niveau (FIGUR 7). Disse resultater tyder på, at det tilsatte RP4 ikke alene kunne spredes fra det tilsatte *Pseudomonas putida*, men også overleve i de naturlige bakterier under sandfilterlignende forhold, dvs. med lav temperatur og konstant vandflow.



FIGUR 7. Proof-of-concept med spredning af modelplasmid (RP4) i sand fra vandværk til andre naturligt forekommende bakterier.

Anvendelse af bakterier med pesticidnedbrydende egenskaber til en hurtig opstart af nye sandfiltre blev undersøgt på rent sand (sand uden mikrobiel vækst). I kolonner med rent sand og sandfilterlignende forhold, blev modelstammen, *Pseudomonas putida*, med RP4 tilsat. Overlevelse af modelstammen og RP4 blev detekteret vha. qPCR, hvor man kunne differentiere mellem *Pseudomonas putida* (*dsRed*-gen på kromosomet) og det tilhørende RP4 (*gfp*-gen på plasmidet). Kolonner blev opsat i et 10°C køleskab med konstant vandflow (hanevand tilsat 0,5 mg NH₄) for at simulere de naturlige forhold i sandfiltrene på vandværkerne.

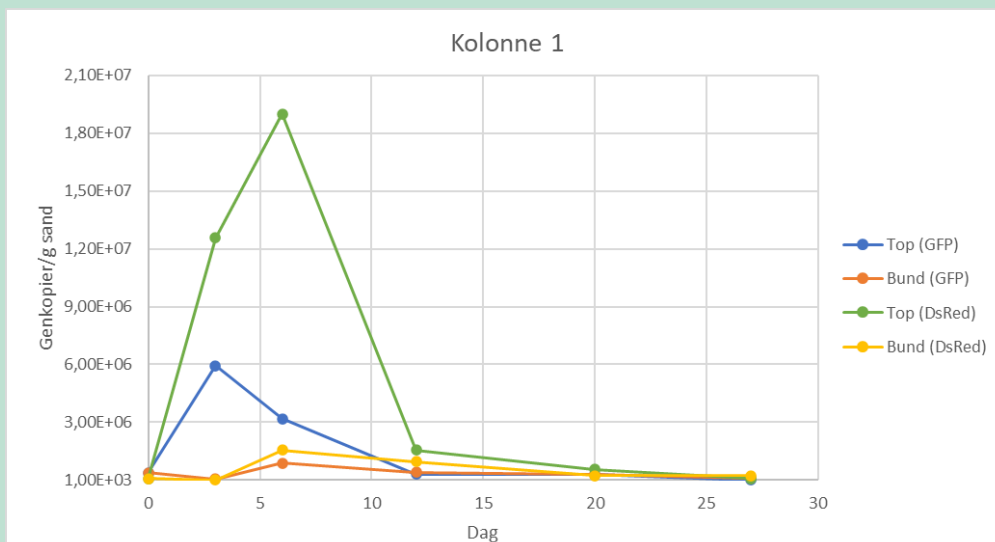
Opsætningen bestod af fire kolonner, hvoraf den første var kommercielt sand uden naturligt forekommende bakterier, og de sidste tre var frisk sand fra vandværker med naturligt forekommende bakterier. Opsætningen ses på FIGUR 8.



FIGUR 8. Kolonner i køleskab ved 10°C. Første kolonne til venstre indeholder rent sand uden naturligt forekommende bakterier, og de tre efterfølgende kolonner indeholder sand med naturligt forekommende bakterier. Igennem kolonnerne sendes hanevand tilsat 0,5 mg/L NH_4 for at efterligne forholdene ved et sandfilter på et vandværk.

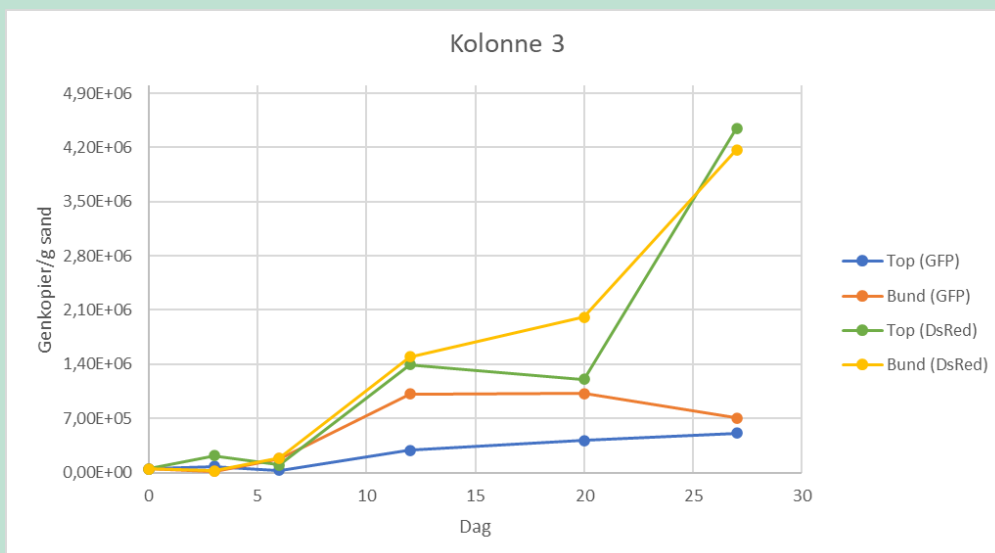
Dette koncept skulle vise, om det var muligt for modelbakterien og dens MGE (RP4) at etablere sig i sandet, og om RP4 spredtes, og hvor i sandets forskellige lag overlevelsen er bedst (hvh. top og bund).

Som det fremgår af FIGUR 9, blev der i kolonnen med rent sand observeret en initial stigning i antallet af modelbakterier (DsRed), men efter 12 dage faldt niveauet drastisk, og der kunne ikke detekteres nogen modelbakterier. Mængden af RP4 blev reduceret svarende til antallet af modelbakterier. Dette tyder på, at modelstammen og RP4 ikke kunne etableres sig i et sandfilter uden naturligt forekommende bakterier.



FIGUR 9. Kolonisering af rent sand uden naturligt forekommende bakterier over tid, med tilsat modelbakterier indeholdende RP4. GFP viser mængden af plasmidet der kan måles i hhv. top (blå) og bund (orange) af kolonnen. På samme måde indikerer DsRed mængden af *Pseudomonas* der detekteres i kolonnens top (grøn) og bund (gul). Her ses en stigning af *Pseudomonas* efterfulgt af et fald.

Til gengæld viste forsøget i kolonner med frisk, levende sand fra et vandværk med tilhørende naturlig, mikrobiel aktivitet (FIGUR 10), at de tilførte donorceller (*Pseudomonas putida*) etablerede sig fint i sandfilteret efter 7 dage. I løbet af forsøgsperioden blev mængden af donorceller 10-doblet. Tilsvarende kunne man observere, at mængden af RP4-kopier også øges, om end ikke i lige så høj grad, hvilket kunne indikere et mindre tab af RP4 fra donorceller.



FIGUR 10. Mulig spredning af *Pseudomonas putida* samt RP4 i sandkolonner med sand fra et vandværk. GFP viser mængden af plasmidet der kan måles i hhv. top (blå) og bund (orange) af kolonnen. På samme måde indikerer DsRed mængden af *Pseudomonas* der detekteres i kolonnens top (grøn) og bund (gul). Her ses en stigning af *Pseudomonas* samt en mindre stigning af mængden af plasmidet.

9. Test af nedbrydning af MCPP og BAM i vandværker ved forsøg i pilotskala og semiteknisk fuldskala

Det er nødvendigt at bringe bioteknologien op i skala, hvilket forudsætter opførelse af et pilot-anlæg og kørsel og optimering under de driftsforhold, som er repræsentative for forholdene i fuldskala. De optimale driftsforhold under test af teknologien, fastlagt vha. proof-of-concept (se afsnit 8), vil blive anvendt som udgangspunkt ved konstruktion af pilotskalaforsøg på vandværkerne.

Pilotskalaanlægget blev opsat på et vandværk hos hhv. Hjørring Vandselskab og Herning Vand. Pilotanlægget, der var placeret i en container, bestod af identiske pilotskalakolonner, hvis opbygning er skaleret efter sandfiltre på et vandværk. Indløbsvand til kolonnerne hentes umiddelbart efter forfiltre på vandværket, og vandgennemstrømning (per cm²) tilpasses de aktuelle forhold på vandværket. Alt efter vandværket, var flow tilpasset til 60-80 L/h. Pilotskalakolonner blev brugt til forsøg med:

1. sandtransplantation fra 2 naturlige sandfiltre med påvist pesticidnedbrydende evne til pilotskalakolonner med filtersand fra det pågældende vandværk uden observeret nedbrydningsevne
2. tilførsel af de udvalgte isolater (MCCP, BAM) under de optimale forhold.

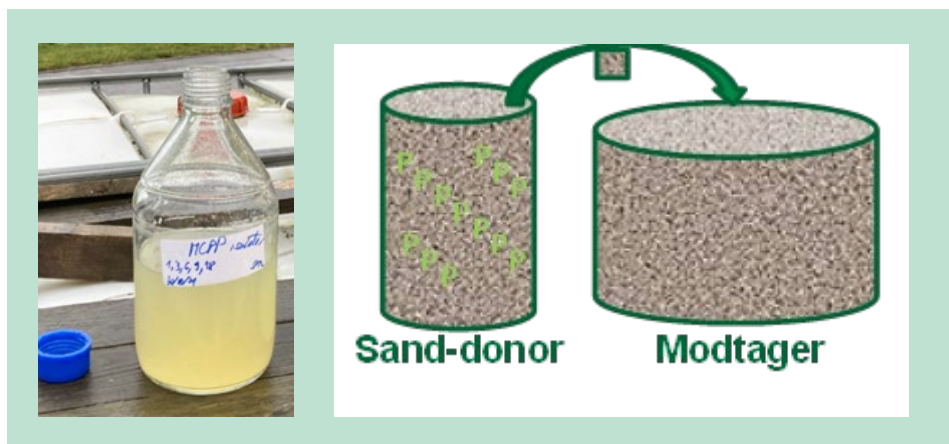
Effekten på pesticidfjernelsen over ca. 2 måneder med hhv. sandtransplantation og inokulering følges med kemiske analyser af ind- og udløbsvand.

Effekten af den dobbelte sandtransplantation, dvs. transplantation af sand fra en kolonne, som et par måneder forud er blevet transplanteret med donorsand fra et andet sandfilter, og som over perioden på 2-3 måneder er modnet, for nu selv at fungere som donorkolonne til et opkommende filter, undersøges i semiteknisk storskala ved forsøg på Hjørring Vandværk. Effekten af sandtransplantation følges med periodiske, kemiske analyser af ind- og udløbsvand.

I projektet fik man igennem pilotskalaforsøg ved vandværkerne i Herning og Hjørring testet reduktionen af pesticiderne MCPP (Herning og Hjørring) og BAM (Hjørring). En uddybende forklaring omkring opsætning af pilotskalaforsøgene gives i de to næste underafsnit. For at opnå en reduktion af pesticider under forsøgene er bakterier med det pesticidnedbrydende gen blevet tilført til forsøgskolonner på to forskellige måder – vha. isolater hhv. ved sandtransplantation – som uddybes nedenfor.

Isolater: På baggrund af tidligere udført arbejde i dette projekt (se afsnit 7) blev 5 pesticidnedbrydende bakterier udvalgt til pilotskalaforsøg. De udvalgte bakterier blev selektivt beriget via frisk sand fra sandfiltre og udsat for talrige molekyllære analyser beskrevet ovenstående. Analyserne er foretaget i laboratoriet ved Teknologisk Institut i Aarhus. Disse bakterier kan hurtigt opformeres i flydende medie og kan derved nemt tilsættes andre sandfiltre, hvor en forventet tilpasning samt etablering af bakterierne vil kunne forventes og således medføre en stigning i pesticidfjernelsen. Til forsøgene blev alle isolater dyrket enkeltvis, hvorefter de blev blandet sammen i en 5 L flaske og anvendt til on-site kolonner (se FIGUR 11).

Sandtransplantation: Sandfiltre, hvori en naturlig nedbrydning af pesticider er identificeret, blev udvalgt til pilotskalaforsøgene. Sand udtaget fra disse sandfiltre (sanddonor) transplanteres over i kolonner med sand fra vandværker, hvori de tilstedeværende bakterier udviser lille eller ingen naturlig pesticidnedbrydning (modtager), se FIGUR 11. Bakterier i det transplanterede sand forventes at ville kunne overleve og formere sig, som dokumenteret under forsøg i laboratorieskala. Således forventes det, at overførslen af en lille mængde sand med indhold af pesticidnedbrydende bakterier vil være tilstrækkelig til, at der i et sandfilter uden naturlig reduktion af pesticider over tid, når bakterierne har etableret og formoreret sig, vil kunne observeres en naturlig fjernelse af pesticider i hele sandfilteret.



FIGUR 11. Opdyrkede isolater og sandtransplantationskoncept med donor og modtager.

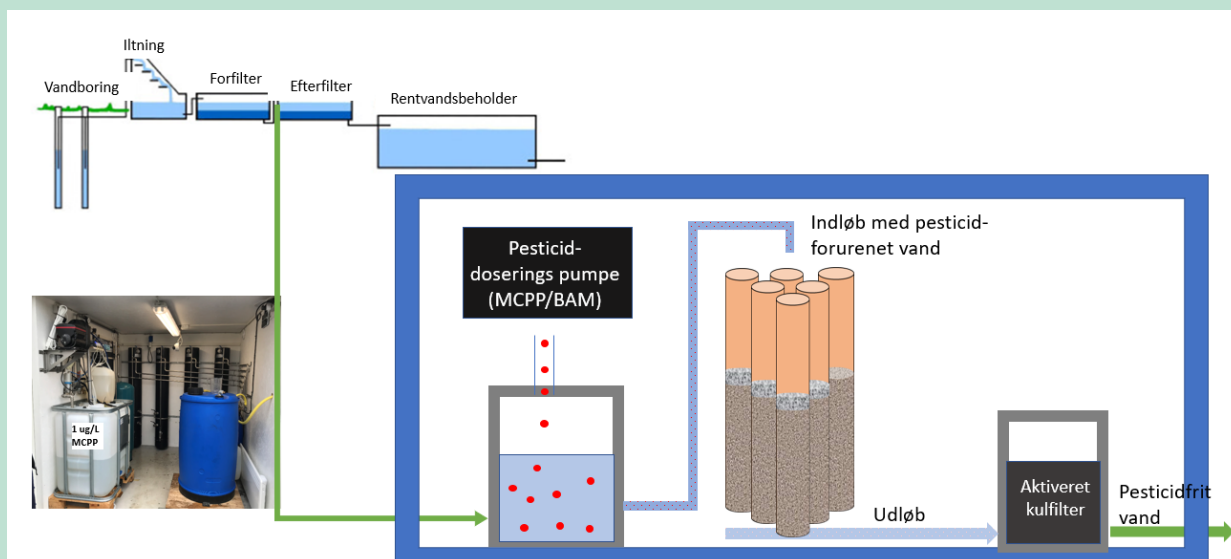
9.1 Pilotskalaforsøg

Pilotskalaforsøgene blev udført ved Herning Vand og Hjørring Vandselskab, som begge har udfordringer med indhold af bl.a. MCPP og BAM i flere grundvandsboringer, og som efterspørger en naturligt forekommende mikrobiologisk population i sandfiltrene, som kan nedbryde disse pesticider.

9.1.1 Pilotskalaforsøg ved Herning Vand (MCPP)

Pilotskalaforsøget ved Herning Vand blev opstillet i november 2021 og afsluttet i januar 2022, med en forsøgsperiode på i alt 65 dage. Forsøg blev opsat i en 22" container, hvor temperaturen blev holdt på ca. 10°C, primært på grund af det 10 grader kolde grundvand. En radiator forhindrede eventuel frost. Seks kolonner blev opstillet (H: 200 cm, Ø: 20 cm) og vand blev tilført kolonnerne fra vandværkets efterfilter. Vandet blev løbende tilsat MCPP til en koncentration på 1,0 µg/L, før kontakt med kolonnerne, for at sikre en kendt minimumkoncentration af MCPP. Flowet igennem kolonnerne var 60-80 L/t. Kolonnerne blev fyldt med grus i bunden for at undgå tilstopning. Ovenpå gruset, blev der tilsat sand fra et af Herning Vands sandfiltre.

I FIGUR 12 vises hele opstillingen ved Herning Vand, hvor den blå firkant repræsenterer containeren. Som beskrevet ovenfor, blev vand fra efterfilteret ledt ind i containeren, hvor MCPP blev tilsat, før vandet blev filtreret gennem kolonnerne. Slutteligt var der opsat et aktivt kulfilter for at sikre, at der ikke blev ledt MCPP ud fra containeren, hvis ikke MCPP blev nedbrudt i kolonnerne. FIGUR 13 viser den faktiske opstilling ved Herning Vand.



FIGUR 12. Opstilling af containeren. Det demonstreres, hvordan vandet føres fra vandværket ud til containeren, hvor pesticid tilsættes, hvorefter vandet føres igennem forsøgskolonner. Den blå firkant repræsenterer containeren.

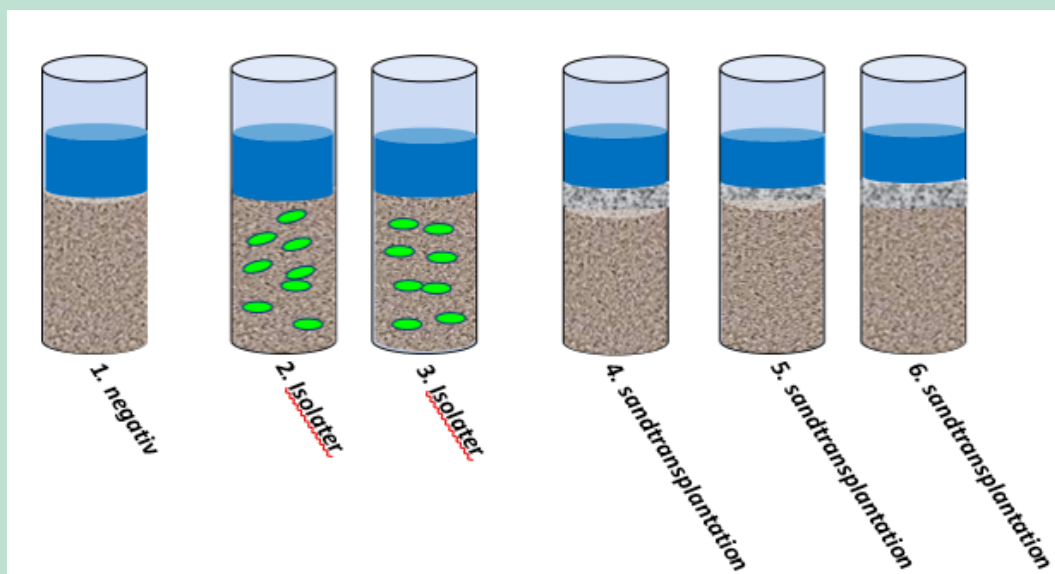


FIGUR 13. Fotodokumentation af forsøgsoptillingen ved Herning Vand.

De 6 forsøgskolonner blev brugt til at undersøge reduktionen af MCP/P, både ved brug af bakterier og ved brug af sandtransplantation (FIGUR 14). Sandet anvendt til sandtransplantationsforsøg var frisk sand fra Kerteminde Vandværk udvalgt på baggrund af tidligere arbejde samt litteratur (Hedegaard & Abrechtsen, 2014), hvor det blev vist, at der naturligt var en reduktion af MCP/P i Kerteminde Vandværks sandfilter. Derudover blev der også afprøvet sand fra vandværket ved Bregnerød Vandværk (forprojekt) for at teste muligheden for, at flere vandværker havde en naturlig mikrobiel MCP/P-nedbrydning.

Kolonnerne i containeren ved Herning Vand var inddelt således:

1. Kontrolkolonne. Kun bestående af sand fra et af Herning Vands sandfiltre.
2. Isolater. Sand fra et sandfilter ved vandværket tilført MCPP-nedbrydende bakterier.
3. Isolater. Sand fra et sandfilter ved vandværket tilført MCPP-nedbrydende bakterier.
4. Sandtransplantation. 10 % frisk sand fra et sandfilter ved Bregnerød Vandværk lægges i toppen af kolonne med 90 % sand fra et sandfilter ved Herning Vand.
5. Sandtransplantation. 1 % frisk sand fra et sandfilter ved Kerteminde Vandværk lægges i toppen af kolonne med 99 % sand fra et sandfilter ved Herning Vand.
6. Sandtransplantation. 10 % frisk sand fra et sandfilter ved Kerteminde Vandværk lægges i toppen af kolonne med 90 % sand fra et sandfilter ved Herning Vand.



FIGUR 14. Overblik over sandfiltre i pilotskaladrift. Der testes dels tilsætning af bakterier med pesticidnedbrydende egenskaber, dels effekten af sandtransplantation fra hhv. Kerteminde Vandværk og Bregnerød Vandværk.

Bakterierne, der blev tilsat til kolonnerne med sand fra Herning Vands sandfilter, var tidligere isoleret i laboratoriet på Teknologisk Institut. Inden tilsætningen blev isolaterne opformeret i laboratoriet. Isolaterne blev blandet med sand og tilført kolonnerne, hvor en mindre mængde vand var tilsat for at undgå udtørring. Kolonner med sand og tilførte isolater fik lov at stå på standby i 48 timer, for at sikre at isolaterne ikke bliver vasket ud den første time med flow i kolonner. Efter 48 timer startede vandflow (60-80 L/t) som beskrevet.

Vandprøver blev løbende indsamlet undervejs i projektet. Disse blev indsamlet både ved indløb til kolonnerne (vand tilsat 1,0 µg/L MCPP) samt to steder i hver kolonne: i midten af kolonnen samt ved kolonnens udløb. Derudover blev der udtaget en vandprøve ved udløb til kloak efter kulfilteret, for at sikre at der ikke blev udledt MCPP til kloakken.

På FIGUR 15 er de forskellige prøvetagningssteder vist vha. pil og cirkler. Den røde pil indikerer indløb til kolonnen. På kolonnen vises en rød cirkel, der indikerer prøvetagningsstedet fra midten af kolonnen. Ved den blå tønde opsamles alt udløbsvand fra kolonnerne, så her indikerer den røde cirkel prøvetagningsstedet for udløbsvandet.



FIGUR 15. Overblik over prøvetagningssteder under pilotskalaforsøget. Den røde pil indikerer indløb til kolonnen. Den røde cirkel på kolonne indikerer den midterste prøvetagning og en røde cirkel ved den blå tønde indikerer udløbsprøvetagningerne.

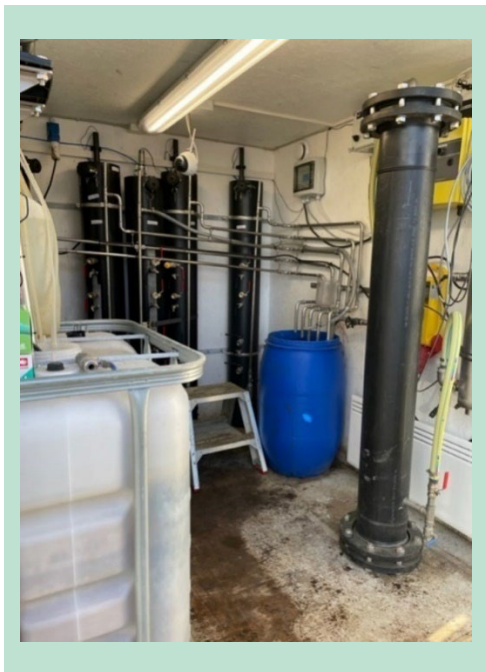
Vandprøverne blev i løbet af forsøgsperioden på 65 dage udtaget på dag 7, 30 og 65. Herefter blev vandprøverne analyseret for MCPP ved Eurofins Steins Laboratorium A/S. Resultaterne er vist og diskuteret senere i dette kapitel.

Sandtransplantation med sand fra Bregnerød havde ikke den ønskede reduktion af MCPP og blev derfor ikke medtaget til pilotskalaopsætningen ved Hjørring Vandselskab (se FIGUR 21).

9.2 Pilotskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab (MCPP og BAM)

Pilotskalaforsøget ved Hjørring Vandselskab blev opstillet i februar 2022 og afsluttet i april 2022 med en forsøgsperiode på i alt 60 dage. Containeren med forsøgsopstilling hos Herning Vand blev efter afslutning flyttet til Hjørring Vandselskab. Forsøget blev opført ligesom ved Herning Vand, dog blev der ved Hjørring Vandselskab udover MCPP også testet for reduktionen af BAM.

Forsøgene ved Herning Vand og Hjørring Vandselskab var stort set identiske, bortset fra antal testede pesticider (Herning kun MCPP, Hjørring MCPP og BAM). Desuden blev det efter ikke-lovende resultater besluttet at udelukke sand fra Bregnerød Vandværk som leverandør af donorsand til sandtransplantation og udelukkende benytte sand fra Kerteminde Vandværk som donorsand denne gang. Der blev således kun medtaget 5 af de installerede kolonner i containeren. Efter endt forsøgsperiode ved Herning Vand blev det aktive kulfilter i containeren desuden fornyet for at forhindre eventuel udledning af MCPP- og/eller BAM-rester fra containeren. Se FIGUR 16 for opstillingen ved Hjørring Vandselskab.

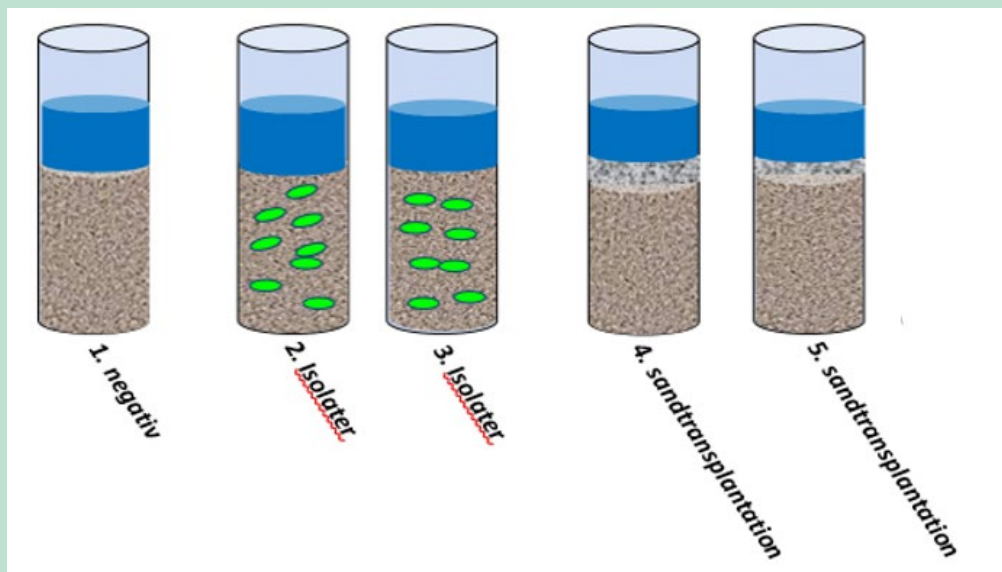


FIGUR 16. Oversigt over pilotskalaopstilling ved Hjørring Vandselskab, hvor i alt 5 kolonner blev testet.

Kolonnerne ved Hjørring Vandselskab var inddelt således:

1. Kontrolkolonne bestående af sand fra et sandfilter fra Hjørring Vandselskab
2. Isolater. Sand fra et sandfilter ved vandværket tilført MCP- og BAM-nedbrydende bakterier.
3. Isolater. Sand fra et sandfilter ved vandværket tilført MCP- og BAM-nedbrydende bakterier.
4. Sandtransplantation. 10 % frisk sand fra et sandfilter ved Kerteminde Vandværk lægges i toppen af kolonne med 90 % sand fra et sandfilter ved Hjørring Vandselskab
5. Sandtransplantation. 10 % frisk sand fra et sandfilter ved Kerteminde Vandværk lægges i toppen af kolonne med 90 % sand fra et sandfilter ved Hjørring Vandselskab.

Se FIGUR 17 for oversigt over kolonnerne ved Hjørring Vandselskab.



FIGUR 17. Overblik over sandfiltre i pilotskaladrift. Der testes tilsætning af isolater med pesticidnedbrydende egenskaber, samt effekten af sandtransplantation fra Kerteminde.

Isolaterne, der blev tilsat til kolonnerne med sand fra Hjørring Vandselskab var også tidligere isoleret på laboratoriet. Inden tilsætningen af isolaterne blev disse opformeret i laboratoriet. Isolaterne blev blandet med sand og tilsat kolonnerne sammen med lidt vand for at undgå udtørring. Kolonnerne blev holdt på standby i 48 timer, for at undgå udtørring, hvorefter det normale vandflow på 60-80 L/t blev startet.

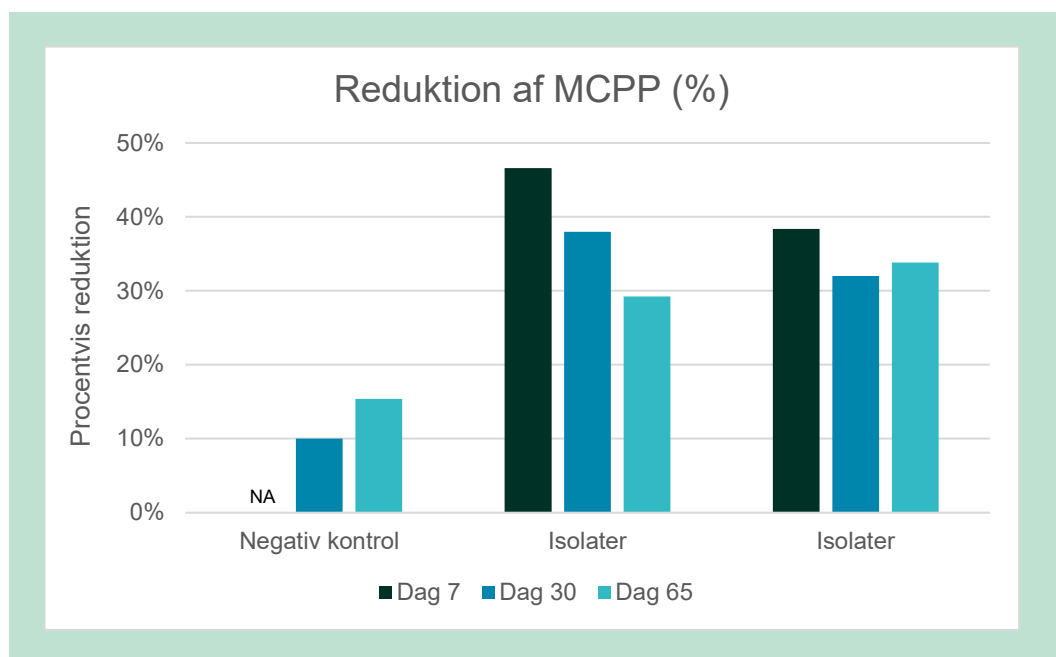
Vandprøver blev indsamlet undervejs i projektet. Vandprøverne blev udtaget ved samme prøvetagningssteder som ved Herning Vand (FIGUR 15). Vandprøverne blev i løbet af de 60 dage udtaget dag 7, 30 og 60. Herefter blev vandprøverne analyseret for MCPP og BAM ved Eurofins Steins Laboratorium A/S og ved SGS Analytic Denmark A/S.

9.3 Resultater fra pilotskalafor søgene

9.3.1 Effekt af tilsætning af isolater

9.3.1.1 Fjernelse af MCPP vha. isolater under pilotskalafor søg hos Herning Vand

Pilotskalafor søgene ved Herning Vand med tilførsel af isolater viste en betydeligt reduktion af MCPP fra vandet. Over hele forsøgsperioden blev der i sandfilterkolonnerne som var tilsat MCPP-reducerende isolater, observeret en MCPP-reduktion mellem 29-47 % i forhold til MCPP-koncentrationen i indløbsvandet (FIGUR 18). Dette tyder på, at isolaterne (og deres nedbrydende evner) havde etableret sig i sandfilterkolonnerne og ikke blev vasket ud. Trods en baggrundsreduktion af MCPP i sandfilteret uden isolater på mellem 10-15% er det tydeligt, at tilsætning af MCPP-reducerende bakterier havde en positiv effekt på MCPP-reduktionen. MCPP-reduktion i kolonner uden tilsat isolater kan tilskrives enten den eksisterende, mikrobielle reduktion eller den kemiske binding af MCPP-molekylet til sandet, hvoraf det sidstnævnte er mest sandsynligt i disse for søg. Usikkerhederne på analysemålingerne er estimeret op til 15 % (Eurofins). Dette, sammen med udtagelsen af én prøve pr. dag (pga. analysepris), kan betyde at der faktisk ikke er nogen reel forskel på MCPP fjernelsesgraden i kontrolkolonnen på dag 30 og dag 65 (hhv. 10% og 15%).

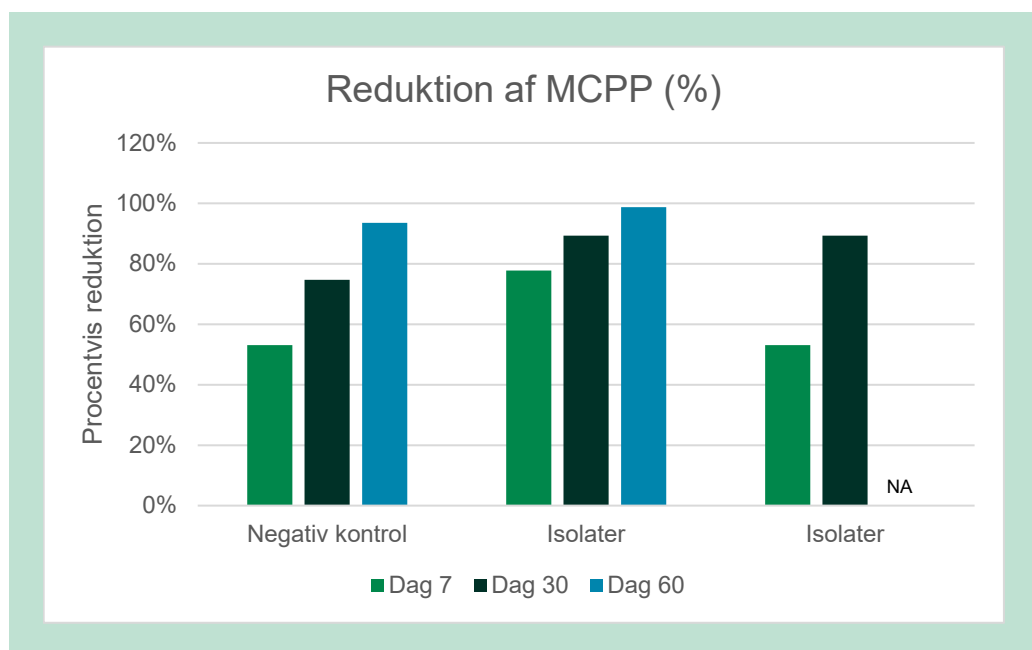


FIGUR 18. Reduktion af MCPP-koncentration ved tilsætning af isolater ved Herning Vand. NA indikerer at prøven ikke er tilgængelig.

9.3.1.2 Fjernelse af MCPP vha. isolater under pilotskalaforøg ved Hjørring Vandselskab

Pilotskalaforøgene med tilsætning af isolater ved Hjørring Vandselskab viser også en positiv effekt af isolater på fjernelse af MCPP (FIGUR 19). Dog ses her, modsat i sandfiltre ved Herning Vand, at sand i kolonnerne uden tilsatte bakterier (negativ kontrol) også i høj grad kunne reducere MCPP fra indløbsvandet. Ved den negative kontrol ses en reduktion, som starter med ca. 50 % ved dag 7 og ender ved op imod 94 % ved dag 60. Den stærkt stigende MCPP-reduktion ved den negative kontrol kan skyldes, at de eksisterende bakterier, som under forsøgsperioden fik tilført en høj koncentration af MCPP, formåede at formere sig, hvilket bevirke, at sandet nu kunne håndtere MCPP. Derfor ses en højere fjernelse ved dag 65 end ved dag 7. Hjørring Vandselskabs sandfilter kunne derfor fremover tænkes som et muligt donor-sandfilter, der kan bruges til andre sandfiltre i forbindelse med sandtransplantation.

Tilsætning af isolater til sandet øgede MCPP-fjernelsen sammenlignet med kontrolkolonnerne både efter dag 7 og dag 30. Det tyder på, at isolaterne ikke er blevet vasket ud. Her kan der dog argumenteres for, at samme tendens med stigende MCPP-reduktion observeres i den negative kontrol, og at det derfor ikke helt kan konkluderes, at det er isolaterne, der bevirker den øgede MCPP-reduktion ved Hjørring Vandcenter, som tilfældet var ved Herning Vand (lav fjernelse af baggrunds-MCPP).

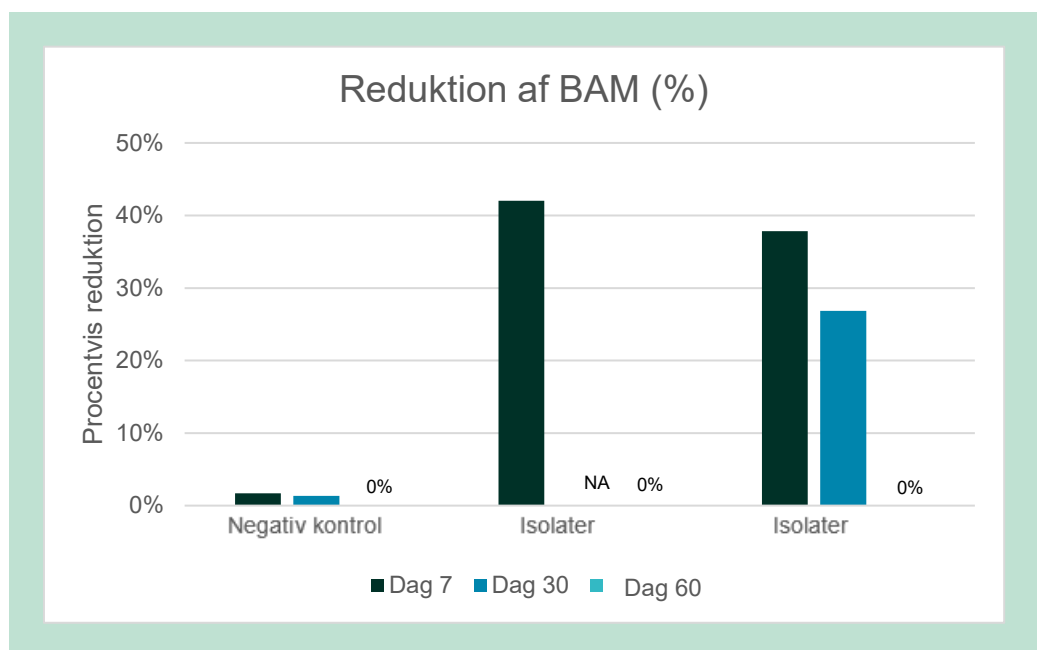


FIGUR 19. Reduktion af MCPP-koncentration ved tilsætning af isolater ved Hjørring Vandselskab. NA indikerer at prøven ikke er tilgængelig.

9.3.1.3 Fjernelse af BAM vha. isolater under pilotskalaforøg hos Hjørring Vandselskab

Udover tilsætning af MCPP-reducerende isolater blev der i de samme sandkolonner i Hjørring også tilført BAM-reducerende isolater. Modsat MCPP-reduktionen antyder resultatet, at Hjørring Vandselskab ikke havde nogen betydelig baggrundsreduktion af BAM i form af kemisk binding eller naturlig nedbrydning, idet reduktionen af BAM var <2 % i kontrolkolonnen.

Derimod var det lettere at observere en reduktion af BAM på dag 7 ved tilførslen af isolater på hhv. 42 % og 38 % i kolonner. Der kunne også observeres en betydelig reduktion af BAM efter 30 dage (>25 %) for den ene kolonne, mens vandprøver fra den anden kolonne blev tabt under transport. Trods en baggrundsreduktion af BAM på 2 %, viste prøverne fra kolonner med isolater 0 % BAM-reduktion ift. Indløbsvand på dag 60. Selvom man forventer den samme baggrundsreduktion i alle kolonner, er en 0 %-måling meget usikker. Dog kunne dette tyde på, at BAM-isolaterne og/eller deres MGE havde meget sværere ved at etablere sig i kolonnerne, se FIGUR 20. Ved den afsluttende prøvetagning på dag 60 kunne der ikke ses nogen reduktion af BAM i nogen af kolonnerne, da man forventer en baggrundsreduktion i alle kolonner, er det uklart, om målingerne på dag 60 er brugbare. Ser man bort fra dem, kan man fra den første periode på 30 dage konkludere, at tilsætning af BAM-isolater havde en positiv effekt på BAM-reduktionen hvorefter bakterierne højst sandsynligt er blevet skyllet ud.



FIGUR 20. Reduktion af BAM-koncentration ved tilsætning af isolater ved Hjørring Vandselskab. NA indikerer at prøven ikke er tilgængelig.

9.3.2 Effekten af sandtransplantation

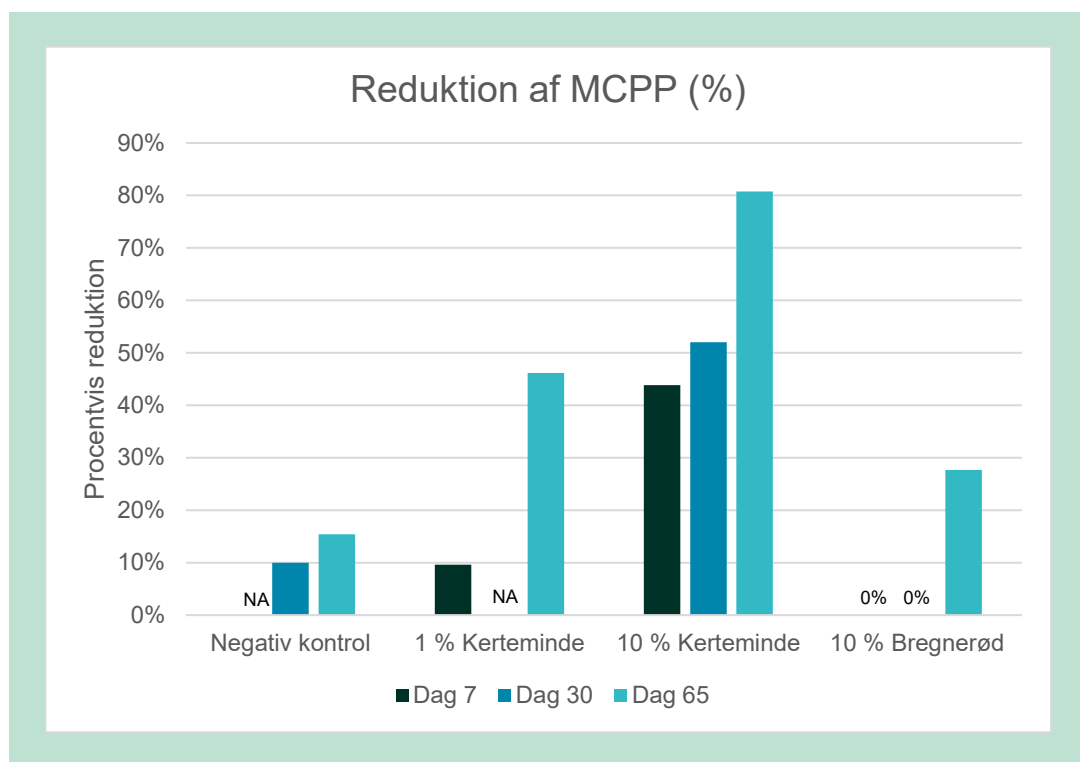
I kolonner ved både Herning Vand og Hjørring Vandselskab blev der foretaget forsøg med sandtransplantation. Her blev sand fra Kerteminde Vandværk og Bregnerød Vandværk tilsat til forsøgskolonnerne i forskellige mængder, hhv. 1 % og 10 % i toppen af kolonnerne. Dog var det kun sand fra Kerteminde Vandværk, der blev arbejdet videre med ved forsøget i Hjørring.

9.3.2.1 Fjernelse af MCPP vha. sandtransplantation under pilotskalaforsøg hos Herning Vand

Ved Herning Vand blev der testet 2 typer donorsand fra hhv. Kerteminde og Bregnerød. Fra Bregnerød Vandværk blev der i toppen tilsat 10 % donorsand oven på 90 % sand fra Herning Vand. Der blev også testet med donorsand fra Kerteminde Vandværk med 10 % og 1 % og hhv. 90 % og 99 % sand fra Herning Vand.

Resultaterne viser en betydeligt øget reduktion af MCPP ved sandtransplantation. Reduktionen var højest med sand fra Kerteminde Vandværk uanset blandingsforhold (1 % eller 10 %). Den største reduktion (op til 81 % dag 65) blev observeret ved tilsætning af 10 % sand fra Kerteminde Vandværk, se FIGUR 21. Dog observeredes også en betydelig reduktion på 46 % på dag 65 i kolonnen tilsat 1 % sand fra Kerteminde Vandværk. Dette tyder klart på, at selv en mindre (1 %) andel transplanteret sand fra Kerteminde Vandværk kunne øge reduktionen af MCPP betydeligt, og det forventes, at kolonnen vil modne over tid og vise de samme resultater som forsøg med 10 % sand.

Det samme kunne forventes for sand fra Bregnerød, hvor kolonnen med tilsat 10 % sand fra Bregnerød Vandværk først viste målbar MCPP-fjernelse efter 65 dage. Dog tyder resultaterne entydigt på, at donorsand fra Bregnerød Vandværk ikke var nær så velegnet som donorsand fra Kerteminde Vandværk, der boostede MCPP-reduktionen med det samme.

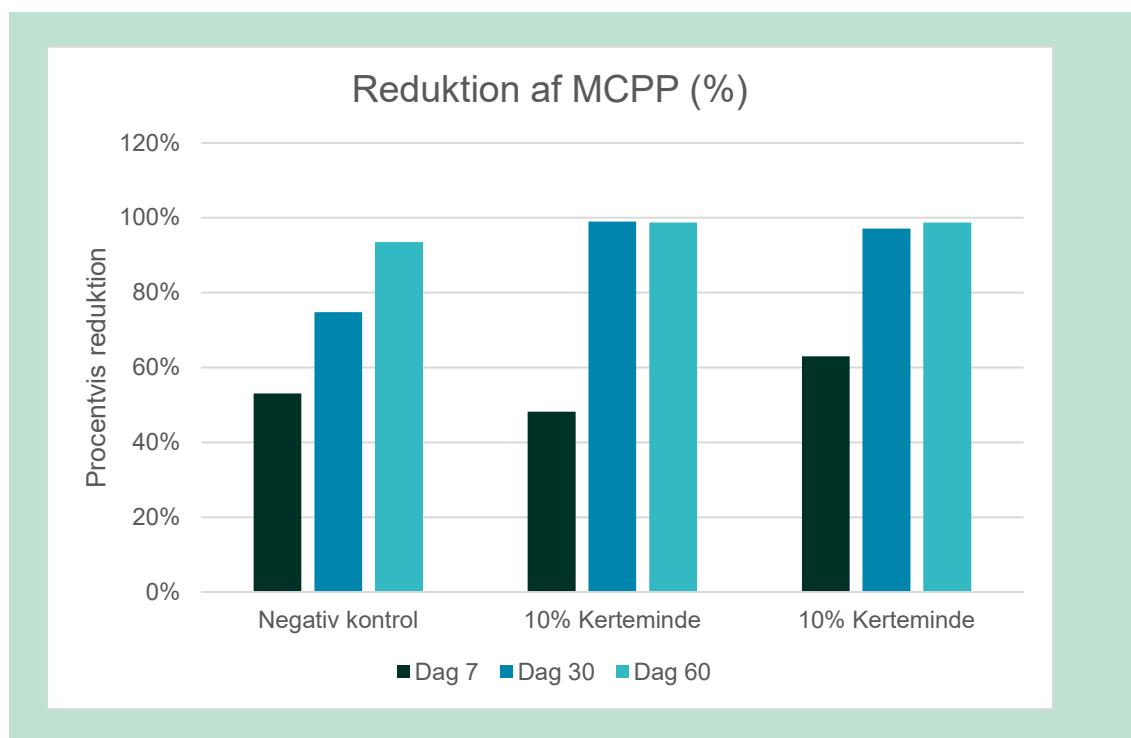


FIGUR 21. Reduktion af MCPP-koncentration ved sandtransplantation ved Herning Vand. NA indikerer at prøven ikke er tilgængelig.

9.3.2.2 Fjernelse af MCPP vha. sandtransplantation i pilotskalafor søg hos Hjørring Vandselskab

I pilotskalafor søg ved Hjørring Vandselskab blev der udelukkende afprøvet kolonner med 10 % sand fra Kerteminde Vandværk, da resultaterne i det afsluttede pilotskalafor søg med sandtransplantation hos Herning Vand viste den højeste reduktion af MCPP i tilsvarende for søgs-kolonne.

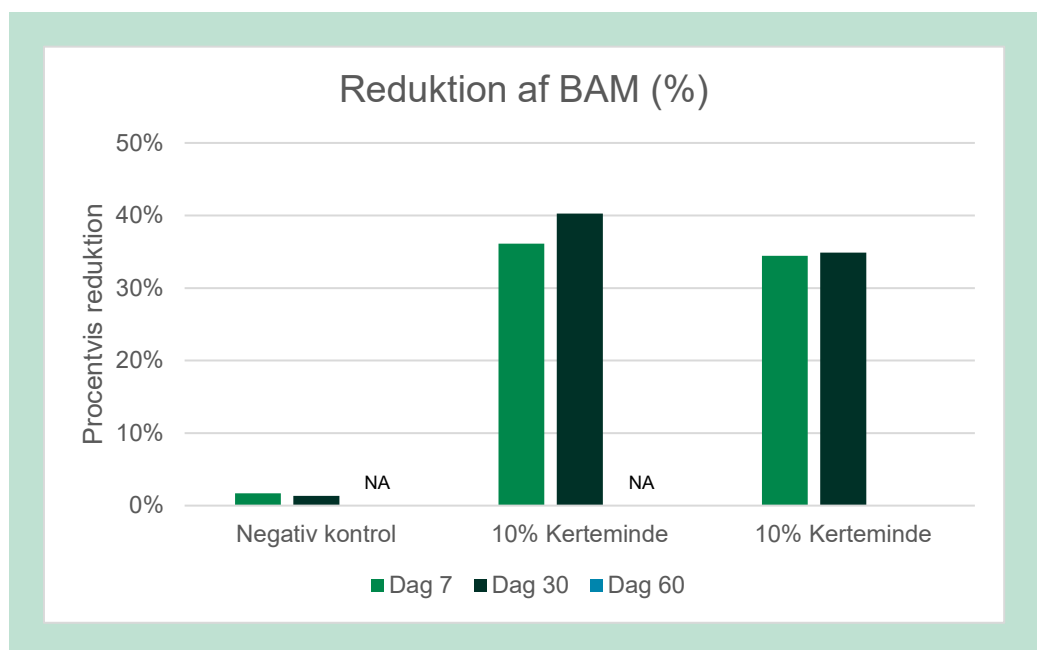
Trods den høje baggrundsreduktion af MCPP ved Hjørring Vandselskab kunne man i kolonnerne med tilført donorsand fra Kerteminde Vandværk konstatere en knap 100 % fjernelse af MCPP, mens fjernelsen i negativ kontrol-kolonne lå på ca. 75 % (FIGUR 22). Det skal dog påpeges, at kontrolkolonnen og kolonnerne med sand fra Kerteminde Vandværk havde et næsten identisk forløb over for søgsperioden mht. den procentvis stigende reduktion af MCPP. Den observerede højere reduktion på dag 30, kunne tyde på en positiv effekt på MCPP-reduktionen ved tilsætning af 10 % donorsand til kolonnerne, selv med analyseusikkerheden på 15%.



FIGUR 22. Reduktion af MCPP-koncentration ved sandtransplantation ved Hjørring Vandselskab.

9.3.2.3 Reduktion af BAM vha. sandtransplantation under pilotskalafor søg ved Hjørring Vandselskab

Udover at undersøge MCPP-reduktionen i kolonnerne med tilsat donorsand fra Kerteminde, blev der i samme kolonner også analyseret for BAM-reduktionen. Der blev ikke observeret nogen nævneværdig reduktion af BAM i kontrolkolonnen (negativ med en baggrundsreduktion på ca. 2 %), som kun indeholdt sand fra Hjørring Vandselskab. Derimod kunne man konstatere en reduktion op til 40 % i kolonnerne tilført 10 % sand fra Kerteminde Vandværk. Den observerede reduktion af BAM var stabil i de første 30 dage ved begge kolonner. De sidste målinger ved dag 60 viste ingen BAM-reduktion i nogen af prøverne (FIGUR 23). Ser man bort fra denne, kan man fra den første periode på 30 dage konkludere, at donorsand havde en positiv effekt på BAM-reduktionen, inden bakterierne formodes at være blevet skyllet ud.



FIGUR 23. Reduktion af BAM-koncentration ved sandtransplantation ved Hjørring Vandselskab. NA indikerer at prøven ikke er tilgængelig.

9.4 Semiteknisk fuldskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab

Der sås positive resultater i form af en højere reduktion af BAM og MCPP i kolonnerne med sandtransplantation, især ved forsøget ved Herning Vand (dette gælder dog kun MCPP). Ved sammenligning med resultaterne fra negativ kontrol-kolonne (baggrund), var det derfor også meget interessant at undersøge, om sand fra Herning Vand, der var modnet med donorsand, over tid (2 måneder) selv ville kunne fungere som donorsand. Når det er interessant at undersøge, er det fordi der ved sandtransplantation i fuldskala vil skulle bruges betydelige mængder sand fra et donorsandfilter. For at undgå at dræne et bestemt vandværks sandfilter helt i forbindelse med sandtransplantation til f.eks. 5-10 andre sandfiltre, er det vigtigt at undersøge, om recipientfilteret (modtager) med etablering af naturlige, MCPP-nedbrydende bakterier kan modne over et par måneder og herefter selv kunne agere donorfilter.

Derfor blev der ved Hjørring Vandselskab opsat en kolonne, hvor sand fra kolonne nr. 6 ved forsøget ved Herning Vand blev brugt som donor. Kolonne nr. 6 bestod oprindeligt af 90 % sand fra Herning Vand tilført 10 % sand fra Kerteminde Vandværk i toppen.

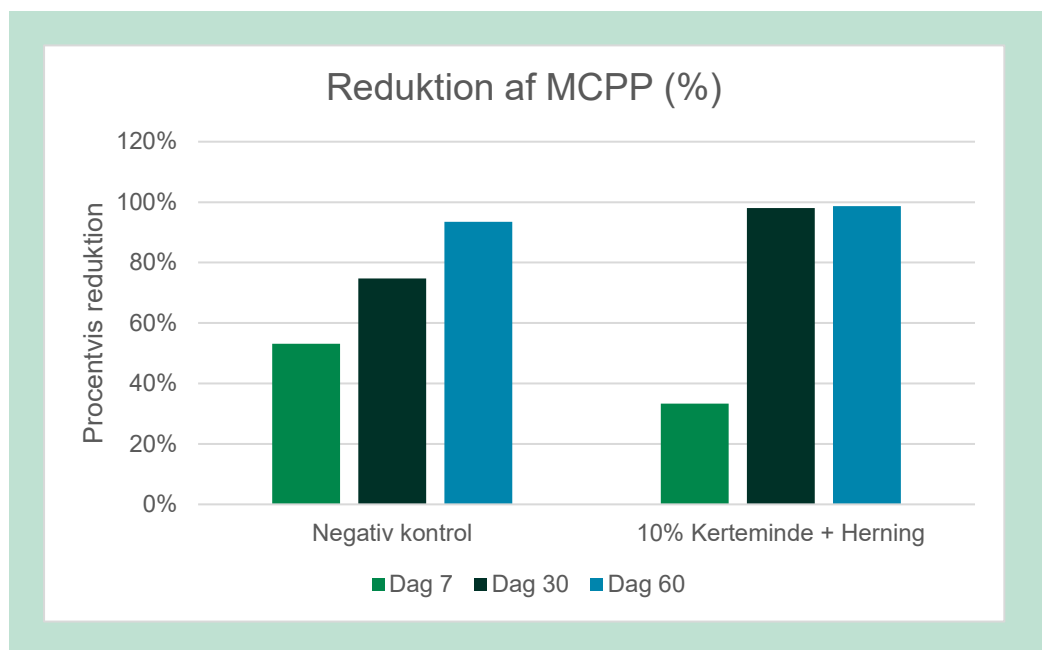
Den semitekniske kolonne i fuldskala bestod af 90 % sand fra Hjørring Vandselskab og i toppen 10 % sand fra kolonne nr. 6 fra forsøget på Herning Vand. Det semitekniske fuldskalaforsøg blev afprøvet samtidig med pilotskalaforsøget ved Hjørring Vandselskab og analyseret for MCPP og BAM. Detaljer omkring forsøgsperiode, container, prøvetagninger mv. kan ses under afsnittet om pilotskalaforsøget ved Hjørring Vandselskab (se afsnit 9.2).

9.4.1 Resultater fra semiteknisk fuldskalaforsøg ved Hjørring Vandselskab

Mht. reduktion af MCPP under forsøgsperioden for det semitekniske fuldskalaforsøg observeredes en stigende reduktion af MCPP efter 30 dage, fra en baggrundsreduktion på ca. 75 % til 100 % ved tilsætning af donorsand. Derfor kan der argumenteres for, at den modnede kolonne fra Herning Vand med en andel 90 % sand fra Herning Vand og 10 % sand fra Kerteminde Vandværk nu ville kunne fungere som donorsand.

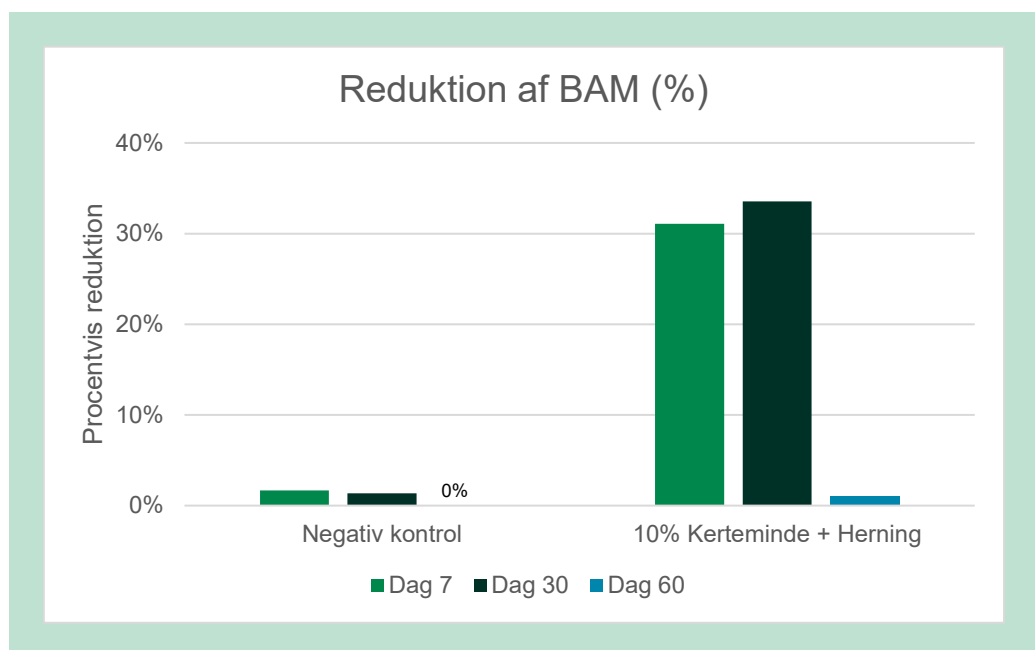
Dette er en interessant observation, fordi det indikerer, at sand fra Herning Vand uden naturlige MCPP-reducerende bakterier (lille baggrundsreduktionsevne) efter tilførsel af sand fra den

forrige donor, Kerteminde Vandværk, kunne modne og etablere sig og herefter videregive den MCPP-reducerende egenskab til et helt tredje sandfilter (Hjørring Vandværk) og således selv blive sanddonor til andre vandværker. Det er meget positivt, da sandtransplantation ellers på længere sigt ville kunne dræne et vandværk for alt sand, der naturligt har pesticidreducerede bakterier. Det skal dog pointeres, at reduktionen på negativ kontrol-kolonnen i Hjørring tilsvare disse resultater, hvilket gør det svært at afgøre, om det er det transplanterede sand, der viser en effekt, eller om reduktionen skyldes de naturlige bakterier i sandet fra Hjørring vandværk. Der skal dog påpeges, at negativ kontrol-kolonnen og kolonner med sand fra Herning begge havde en reduktion af MCPP over forsøgsperioden.



FIGUR 24. Reduktion af MCPP-koncentration ved den dobbelte sandtransplantation ved Hjørring Vandselskab.

Den dobbelte sandtransplantation viste, at der kunne observeres en betydelig BAM-reduktion i den semitekniske fuldskalakolonne på ca. 30 %, versus baggrundsreduktionen i negativ kontrol-kolonnen på ca. 2 %. De 30 % blev dog reduceret til 0 % efter 60 dage. Hvis man ser på den betydelige reduktion af BAM på dag 7 og dag 30 i kontrolkolonnen, vil man uden tvivl kunne konkludere, at den dobbelte sandtransplantation havde en positiv effekt på MCPP- og BAM-reduktionen, især i de første 30 dage af forsøget.



FIGUR 25. Reduktion af BAM-koncentration ved sandtransplantation ved Hjørring Vandsekskab. NA indikerer at prøven ikke er tilgængelig.

9.5 Konklusion

Ud fra pilotskalaforsøgene kan det konkluderes, at både tilførslen af isolater og tilsætning af donorsand ved sandtransplantation havde en positiv effekt på filternes reduktion af de undersøgte pesticider, MCPP og BAM.

I forsøgene med sand fra Herning Vand er det især reduktionen af MCPP, som stiger i ekstremt høj grad ved tilførsel af MCPP-reducerende isolater eller af det udvalgte donorsand fra Kerteminde Vandværk. Forsøgene viste, at hverken isolater eller de naturlige bakterier tilført ved sandtransplantation blev udvasket over tid. Tværtimod ser det ud til, at disse kunne etablere og formere sig i kolonnerne og øge MCPP-reduktionen til hele 80 %. Forsøgene ved Hjørring Vandsekskab viste ligeledes en positiv effekt på MCPP-reduktionen i sandkolonnerne tilført MCPP-isolater eller ved sandtransplantation, trods den forholdsvis høje, naturlige MCPP-baggrund ved Hjørring. Reduktionen af BAM ved Hjørring var mindre og blev kun observeret ved dag 30. Overordnet kan det forventes, at tilsætning af MCPP- og BAM-isolater og sandtransplantation, som var en del af strategien i forprojektet, Den Trojanske Hest, er en holdbar løsning til mange danske vandværker ift. at booste reduktionen af bestemte pesticider i værkernes sandfiltre.

Her kunne det dog være interessant at afprøve sand fra andre vandværker som donorsand og undersøge, hvorvidt der kan isoleres andre naturlige bakterier, der kunne have en højere effektivitet med hensyn til reduktion.

Det semitekniske forsøg viste, at den dobbelte sandtransplantation også er en særdeles brugbar tilgang, der vil kunne sikre, at man ikke løber tør for donorsand, idet de sandfiltre, der modtager sand i første omgang, kan fungere som donorer efter et par måneders modning.

Idet isolering af naturlige bakterier er meget tidskrævende (berigelse, isolering og molekylær verifikation af disse (1-2 år)), kunne tilgangen med sandtransplantation være at foretrække fremover, idet den kræver korte forsøg (3 måneder).

10. Referencer

- Buttiglieri, G., Peschkla, M., Frömel, T., Müller, J., Malpei, F., Seel, P., & Knepper, T. P. (Juni 2009). Environmental occurrence and degradation of the herbicide n-chloridazon. *Water Research*, s. 2865-2873.
- Hedegaard, M. J., & Abrechtsen, H.-J. (2014). Microbial pesticide removal in rapid sand filters for drinking water treatment – Potential and kinetics. *Water Research*.
- Hedegaard, M. J., Deliniere, H., Prasse, C., Dechesne, A., Smets, B. F., & Albrechtsen, H.-J. (Februar 2018). Evidence of co-metabolic bentazone transformation by methanotrophic enrichment from groundwater-fed rapid sand filter. *Water Research*, s. 105-114.
- Hedegaard, M. J., Schliemann-Haug, M. A., Milanovic, N., Lee, C. O., Boe-Hansen, R., & Albrechtsen, H.-J. (Juni 2020). Importance of Methane Oxidation for Microbial Degradation of the Herbicide Bentazone in Drinking Water Production. *Frontiers in Environmental Science*.
- Kowal, S., Balsaa, P., Werres, F., & Schmidt, T. C. (November 2009). Determination of the polar pesticide degradation product N,N-dimethylsulfamide in aqueous matrices by UPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, s. 1787-1794.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., . . . Gawlik, B. (2010). Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*, s. 4515-4126.
- Schmidt, C. K., & Brauch, H.-J. (2008). N,N-Dimethylsulfamide as Precursor for N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Formation upon Ozonation and its Fate During Drinking Water Treatment. *Environ. Sci. Technol.*, s. 6340-6346.
- Thorling, L. A. (2021). *Grundvand. Status og udvikling 1989-2019*. GEUS.
- Thorling, L. A. (2021). *Gundvand. Status og udvikling 1989-2020*. GEUS.
- Wang, C.-C., Li, C.-H., & Yang, C.-F. (2019). Acclimated methanotrophic consortia for aerobic co-metabolism of trichloroethene with methane. *International Biodeterioration and Biodegradation*, s. 52-57.
- Wang, J., Zhang, C., Poursat, B. A., Ridder, D. d., Smidt, H., Wal, A. v., & Dutton, N. B. (November 2021). Unravelling the contribution of nitrifying and methanotrophic bacteria to micropollutant co-metabolism in rapid sand filters. *Hazarsous Materials*.

Pesticidfrit drikkevand - Naturlig biologisk fjernelse af pesticider i sandfiltre på vandværker

Formålet med dette projekt var at udvikle biologiske metoder til reduktion af de rester af pesticider, som findes i dansk grundvand.

Naturlig forekomst af pesticidnedbrydende bakterier i naturen er påvist. En udnyttelse af disse bakterier til reduktion af pesticider i sandfiltrene på danske vandværker vil være en nem og skånsom metode til reduktion af pesticider i drikkevandet.

På baggrund af de udførte forsøg kan det konkluderes, at tilgangen med MCPP- og BAM-isolater samt tilgangen med enkelt og dobbelt sandtransplantation, er brugbare biologiske metoder, der vil kunne anvendes til en betydelig og stabil reduktion af MCPP og BAM i drikkevand på de danske vandværker.



Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk