



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

BioBox

Bioteknologi til klimaneutral drikkevands- produktion

MUDP-rapport

MUDP Rapport

Juli 2023

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Teknologisk Institut

Sanin Musovic

Julie Bruun Jensen

Caroline Kragelund Rickers

Grafiker/bureau:

Teknologisk Institut

Fotos:

Teknologisk Institut

ISBN: 978-87-7038-528-2

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

Forord	5
1. Sammenfatning og konklusion	6
1.1 Sammenfatning	6
1.2 Konklusion	6
2. Summary and conclusion	8
2.1 Summary	8
2.2 Conclusion	8
3. Formidling	10
3.1 Konferencer	10
3.2 Presse	10
4. Introduktion	11
5. Forekomst af metan i grundvandet	13
5.1 Forekomst af metan i dansk grundvand	13
5.2 Forekomst af metan i grundvand i Europa og USA	14
6. MetanOxiderende Bakterier (MOB'er): Vækstforhold og behov for sporstoffer	15
6.1 MOB's metan-monooxygenase-enzym (MMO)	15
6.2 Identificering af sandfiltre med høj forekomst af MOB'er	16
6.2.1 Arbejdsgangen	16
6.3 Resultater	17
7. Identificering af matrice til BioBox'en	19
7.1 Identificering af den bedste matrice til BioBox'en	19
7.2 Test af udvalgte materialer til BioBox'en i laboratorieskala	19
7.2.1 Resultater fra kolonneforsøg i laboratorium med testede filtermatricer	21
7.2.2 Kolonner med skummateriale	21
7.2.3 Kolonner med træflis	23
7.2.4 Kolonner med kompostmateriale	24
7.2.5 Reduktion af metan i laboratoriekolonner med skum eller træflis	24
7.2.6 Opsummering af kolonneforsøg i laboratorieskala	26
7.2.7 Kolonneforsøg i pilotskala	26
7.2.8 Opstilling af pilotskalakolonner	26
7.2.9 Inokulering af pilotskalakolonner	27
7.2.10 Opsummering af kolonneforsøg pilotskala	28
7.2.11 BioBox i semiteknisk fuldskala i Hillerød	28
7.2.12 Opstilling af BioBox'en i Hillerød	29
7.2.13 Inokulering af BioBox'ens skummatrice	30
7.2.14 Fjernelse af metangas i vandværkets udblæsningsluft	32
7.2.15 Udvikling af det mikrobielle samfund i BioBox'en i Hillerød	33
7.2.16 Opsummering af fuldskalaforsøg i Hillerød	35

7.2.17	Semitekniske fuldskalaforsøg i Horsens	36
7.2.18	Fjernelse af metangas i udblæsningsluften på vandværket	38
7.3	Opsummering og konklusion	38
7.4	Projektpartnere	40
8.	Referencer	41

Forord

Projektet BioBox - Bioteknologi til klimaneutral drikkevandsproduktion, der er gennemført af Teknologisk Institut i samarbejde med Hillerød Vand, SAMN-Horsens 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 igennem de fire arbejdsplaner, der oprindeligt var opstillet i projektet.

Projektet er gennemført i perioden januar 2019 til juni 2021. Grundet Coronapandemien er projektet blevet forlænget undervejs, idet den oprindelige slutdato var december 2020.

1. Sammenfatning og konklusion

1.1 Sammenfatning

I Danmark og i mange andre lande verden over produceres drikkevand fra grundvand, hvor de naturligt forekommende forureningsstoffer (såsom NH_4) fjernes i sandfiltre på vandværkerne. Det anaerobe grundvand indeholder store mængder metan, som under iltning processen på vandværket frigives til atmosfæren (>95 %), mens det resterende metan i vandet omsættes af de naturlige metanoxiderende bakterier i drikkevandssandfiltrene.

Drivhusgassen metan er i gennemsnit 20-25 gange kraftigere end CO_2 . På landsplan betyder det - med en drikkevandsproduktion på ca. 420 mio. m^3 om året og en i projektet udregnet vægtet gennemsnitlig værdi på 0.64 g CH_4/m^3 i grundvandet - en udledning på op til 270 tons CH_4 om året (ækvivalenter til ca. 7.000 tons CO_2). En tilsvarende stor udledning af metan forventes af det indvundne grundvand, som efter iltning benyttes i form af drikkevand til diverse formål i industrien og landbruget. Dermed udgør den samlede produktion af drikkevand fra grundvandet et betydeligt bidrag til den globale opvarmning, både i Danmark og i resten af verden.

Formålet med dette projekt var ved anvendelse af den nyeste videnskabelige forståelse af naturlige, metanoxiderende bakterier (MOB), som lever i drikkevandssandfiltre på vandværker, at udvikle en miljøvenlig bioteknologi (BioBox) til omsætning af metangas fra udblæsningsluften fra et vandværks iltningssum. BioBox skulle som en kosteffektiv teknologi (1 øre/ m^3 drikkevand) være attraktiv for danske og europæiske vandværker, som ønsker at gøre en miljømæssig indsats, og sikre forbrugerne en klimaneutral drikkevandsproduktion. Desuden vil udviklingen af BioBox bidrage til en fortsat styrkelse af Danmarks grønne og bioteknologiske image og kontinuert styrke den danske ekspertise indenfor innovative bioteknologier.

For at udvikle en BioBox måtte projektgruppen:

- indsamle og bearbejde publicerede data om MOB'er, med fokus på stimulering af MOB'ers metaboliske evner
- i laboratorietest afprøve flere selekterede matricer beriget med naturlige MOB'er fra sandfiltre, i forhold til matricernes evne til metanreduktion
- i pilotskalaopstilling verificere etablering af MOB-samfund ved skiftende driftsparametre (flow, fugtighed, sporstoffer m.fl.).

1.2 Konklusion

I projektet BioBox forsøgte projektgruppen at udvikle en ny teknologi til reduktion af metan fra udblæsningsluften på vandværker. Det vigtigste ved teknologien var at sikre etablering af naturlige MOB'er fra et sandfilter på en udvalgt matrice og tilføre alle nødvendige sporstoffer med det formål at fjerne metan fra metanholdig luft. Projektet viste, at det er muligt at anvende sandfiltermikrober (MOB'er) til reduktion af metan fra udblæsningsluften på et vandværk.

Det lykkedes projektgruppen at udvikle og verificere den nye bæredygtige bioteknologi, BioBox, som anvender naturlige mikrober fra sandfiltre (MOB'er) til reduktion af metan fra udblæsningsluften på et vandværk, som producerer drikkevand ved anvendelse af grundvand. Teknologien virkede udmærket ved høje metankoncentrationer (>3.000 ppm), men kunne uden videre etableres og effektivt fjerne >45 % metan selv ved metankoncentrationer på 500 ppm.

Teknologien havde dog sine begrænsninger, og forventes ikke at vil være anvendelig i den nuværende form, de steder, hvor metankoncentrationer ligger på mellem 1-32 ppm.

2. Summary and conclusion

2.1 Summary

In Denmark and many other countries around the world, drinking water is produced from groundwater, where the naturally occurring pollutants (such as NH_4) are removed during the filtration through sand filters at the waterworks.

The anaerobic groundwater contains large amounts of gas methane (CH_4), which upon aeration of groundwater at the waterworks is mainly released into the atmospheric air (>95%), while the remaining methane gets converted by the natural methane-oxidizing bacteria (MOB) in drinking water sand filters.

Methane is a greenhouse gas, on average 20-25 times more powerful than CO_2 . On a national level, this means - with a drinking water production of approx. 420 million m^3 per year and an average value of 0.64 g CH_4/m^3 in the groundwater - a discharge of up to 270 tonnes of CH_4 per year (equivalent to 7.000 tonnes of CO_2). A correspondingly large emission of methane is expected from the recovered groundwater, which after aeration is applied in the form of drinking water for various purposes in industry and agriculture. Thus, the total production of drinking water from groundwater makes a significant contribution to the global warming, both in Denmark and in the rest of the world.

The aim of current project was to apply the latest scientific understanding of natural, methane-oxidizing bacteria (MOB), which exist in drinking water sand filters at waterworks, to develop an environmentally friendly biotechnological solution (BioBox) for the reduction of methane from the air leaving waterworks' aerations rooms. As a cost-effective solution (0.1 cent/ m^3 produced drinking water), BioBox should be attractive to Danish and European waterworks that seek a climate-neutral drinking water production. Furthermore, on the national level, the development of BioBox solution will contribute to a continued strengthening of Danish green-image and strengthen Danish expertise within innovative biotechnological solutions.

For the development of BioBox in the project, the project group had to:

- collect and process published data on MOB, focusing on stimulation of MOB's native metabolic capabilities.
- test in the laboratory several potential matrixes, enriched by natural MOB from running sand filters at waterworks, with the focus on their ability for colonisation by introduced MOB's and subsequent methane reduction.
- verify the establishment- activity of MOB communities in a pilot-scale setup, with changing operational parameters (air flow, humidity, trace element, etc.).

2.2 Conclusion

The aim of BioBox project was to develop a novel technology for reduction of methane from the exhaust air leaving waterworks, after aeration of methane-containing groundwater. The crucial matter of the developing technology was to ensure a successful establishment of natural MOB's originating from sand filters on the selected matrix, and continuously provide MOB's with the necessary micronutrients, to ensure removal of methane from the filtrating air. The project showed that it is possible to apply sand filter microbes (MOB's) to reduce methane from the exhaust air at a waterworks.

The project group succeeded in development- and verification of a new sustainable BioBox technology, which applies natural microbes from existing sand filters (MOBs) to reduce methane from exhaust air at a waterworks, which uses groundwater for drinking water production. The technology worked better at higher methane concentrations in the exhaust air (>3,000 ppm), but could also successfully remove >45% methane from exhaust air containing methane around 500 ppm. However, the technology had its limitation, and is expected not to be applicable in the current form at waterworks or other places, where exhaust air contains 1-32 ppm methane.

3. Formidling

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

3.1 Konferencer

- 14th DK: Danish Water Forum. Copenhagen, den 30. januar 2020. Sustainable removal of methane gas from exhaust air of waterworks
- 6th YWPK Conference, Copenhagen, den 6. marts 2020. Sustainable removal of methane gas from exhaust air of waterworks
- DK: DANVA, Dansk Vand Conference, Aarhus, den 25. november 2021. BioBox, Bioteknologi til klimaneutral drikkevandsproduktion.

3.2 Presse

- VTUF-fonden. 2020. Naturlige mikroorganismer begrænser metanudslip (https://www.danva.dk/media/6484/2019_vtumagasin_web.pdf)
- Hillerød Vands hjemmeside den 25. februar 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- Horsens Folkeblad. 19. januar 2020. Vandselskab vil nedbringe metanudslip - to projekter er rullet ud. <https://hsfo.dk/horsens/vandselskab-vil-nedbringe-metanudslip-to-projekter-er-rullet-ud>
- Teknik & Miljø. 28. januar 2020. Bakterier kan hjælpe på drivhuseffekten (<https://is-suu.com/ktc-teknikogmiljo/docs/tmi1-2020>)
- Pro.ing.dk/Watertech. 25. februar 2021. Metan i drikkevand kan fjernes med børnemadrasser og sandkasser (<https://pro.ing.dk/watertech/artikel/metan-i-drikkevand-kan-fjernes-med-boernemadrasser-og-sandkasser>)
- 24nyt.dk. 27. februar 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- Kemifokus.dk. 1. marts 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- Gts-net.dk. 2. marts 2021. Ny løsning fjerner metan fra drikkevandet
- Sn.dk (Sjællands Nyheder). 3. marts 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- TekniskFOKUS.dk. 3. marts 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- Hillerød Posten. 3. marts 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- Installator.dk. 15. marts 2021. Børnemadrasser og sandkasser fjerner metan fra drikkevandet
- Ing.dk (Ingeniøren). 17. marts 2021. Metan i drikkevand kan fjernes med børnemadrasser og sandkasser
- Sn.dk (Sjællands Nyheder). 25. marts 2021. Hillerød Forsyning hjælper forskere med at fjerne drivhusgas (<https://www.sn.dk/hilleroed-kommune/hilleroed-forsyning-hjaelper-forskere-med-at-fjerne-drivhusgas>)

4. 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. I filtrene fjernes de naturlige forureninger i grundvandet (fx NH_4 , Fe og Mn) effektivt via en kombination af mikrobiologiske og kemiske processer, hvorefter rent og sikkert drikkevand leveres til forbrugerne.

Det anaerobe grundvand indeholder naturligt store mængder metan, hvoraf ca. 95 % frigives til luften under iltningssprocessen på vandværket. Den voldsomme (95 %) frigivelse af metan fra grundvandet på landets vandværker er bekymrende, idet metan er en drivhusgas. Det resterende metan (ca. 5 %), som i sandfiltrene bliver fortæret af naturlige MOB'er, omdannes til ufarlig, bakteriel biomasse, der nemt vaskes ud af filtrene med regulære returskyl.

Metangas har i gennemsnit en 20-25 gange kraftigere drivhuseffekt end CO_2 . Gassen er desuden meget flygtig, og det metan, som frigives på vandværkerne, ender hurtigt i atmosfæren. Med en gennemsnitlig drikkevandsproduktion i Danmark på ca. 420 mio. m^3 om året og en gennemsnitlig forekomst på 0,64 g CH_4/m^3 i grundvandet, betyder det, at der på landsplan udledes over 270 tons CH_4 om året (ækvivalenter til ca. 7.000 tons CO_2), som bidrager til den globale opvarmning. Det skal nævnes, at en tilsvarende stor udledning af metan fra grundvand forventes af den del af grundvand, som indvindes og benyttes i industrien, landbruget mv.

Der findes på nuværende tidspunkt ikke nogen økonomisk forsvarlig teknologi, som vil kunne anvendes direkte og løse vandværkernes metanudfordring. Udblæsningsluften fra vandværkerne indeholder nemlig en lav konstant mængde, hvilket vil gøre ethvert forsøg på biogasopsamling urentabelt.

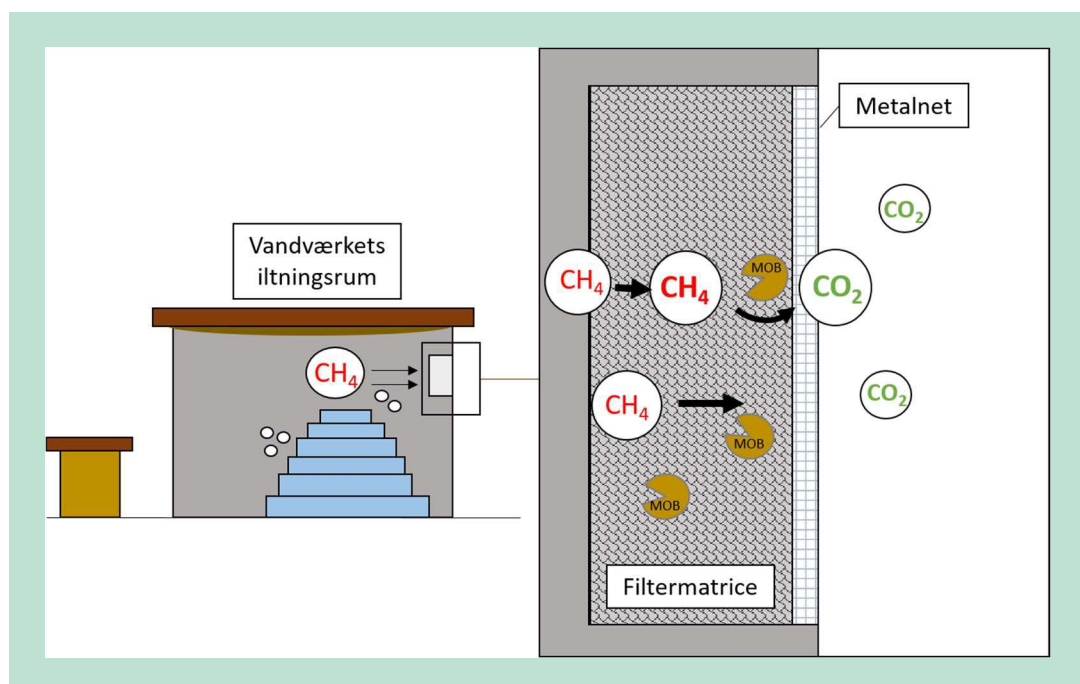
Over det seneste årti er mikrobiologien i drikkevandssandfiltre blevet undersøgt nærmere. Det er i den forbindelse blevet påvist, at sandfiltrene på de danske vandværker er rige på bakterier (ca. en milliard bakterier per gram), som naturligt bærer på en række metaboliske egenskaber. Flere nyere, nationale projekter (fx DWBioFilters (2011-2015), Den Trojanske Hest 2016-2019)) har arbejdet på at udnytte denne store, naturlige mikrobielle ressource i sandfiltre på vandværker til at producere renere drikkevand. Sidstnævnte projekt har fx identificeret enkelte sandfiltre, hvori evnen til naturlig nedbrydning af visse pesticider (fx MCPP og BAM) kunne påvises.

Den videnskabelige forståelse af naturlige, metanoxiderende bakterier (MOB'er) i miljøet har indtil for nylig været mangelfuld, hvilket direkte har udgjort den primære barriere for udviklingen af en teknologi som BioBox'en. Flere nationale projekter har imidlertid over det sidste årti banet vejen for en bedre forståelse og identifikation af MOB'er i miljøet. Teknologisk Institut forventede at anvende identiske molekylære teknikker til detektion af naturlige MOB'er i hhv. modnende kompost anvendt til reduktion af metanudslip fra gamle lossepladser og naturlige MOB'er fra drikkevandssandfiltre på vandværker.

Den nye forståelse af bakteriernes gavnlige egenskaber og vækstbetingelser, med fokus på enzymet pmoA, der fremmer metanreduktionen hos MOB'er, har betydet, at det nu er muligt direkte at kontrollere den mikrobielle aktivitet i bl.a. sandfiltre. Ved simple optimeringer af visse afgørende faktorer (fx sporstoffer), der virker stimulerende på MOB's metabolisme, kan MOB'ernes aktivitet og kapacitet for at reducere metan styres.

I dette projekt bringes den nyeste akademiske viden om MOB'ers metaboliske evner i spil med udviklingen af den innovative teknologi BioBox. BioBox-projektet bringer således den nyeste forskning og vandsektorens miljømæssige udfordring tættere på hinanden med det formål at udvikle en bioteknologisk teknologi til metanneutral drikkevandsproduktion, som imødekommer både forbrugernes og de politiske klimaambitioner. Den endelige BioBox vil bestå af en matrice, der bærer på levende og metabolisk aktive MOB'er, der stammer fra eksisterende drikkevandssandfiltre, og som nu vil kunne reducere metanet i luften fra et vandværks iltningsrum (FIGUR 1).

Projektet gennemføres gennem fire arbejdsplaner. Arbejdsplanerne omfatter en dybdegående vidensindsamling, som sikrer gennemførligheden af projektet (AP1), udvikling af teknologien igennem målrettet forsøgsarbejde i laboratorie- og pilotskala (AP2 og AP3) samt demonstration af den udviklede BioBox (AP4).



FIGUR 1. Skitsering af konceptet bag BioBox. Udblæsningsluft fra iltningsrummet indeholdende metan filtreres igennem BioBox-filtermatrice. Metanoxiderende bakterier (MOB'er), som gror på filtermatricen, oxiderer metan til kuldioxid, som er en 25 gange mildere drivhusgas end metan.

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

- State-of-the-art om MOB'ers vækstforhold og behov for bestemte sporstoffer
- Karakterisering af forekomst af MOB'er i sandfiltrene på udvalgte danske vandværker
- Identificering af den bedste matrice til BioBox'en
- Laboratorieforsøg med isolering af bakterier til de nyligt fundne pesticider DMS og 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 værkernes grundvand. Formålet er at analysere effekten af sandfiltrenes pesticidnedbrydende evne efter hhv. sandtransplantation og tilsætning af isolater til vandværkernes sandfiltre
- Teste potentialet for dobbelt sandtransplantation i sandfilter i semiteknisk skala på partner-vandværkerne i Hillerød og Horsens.

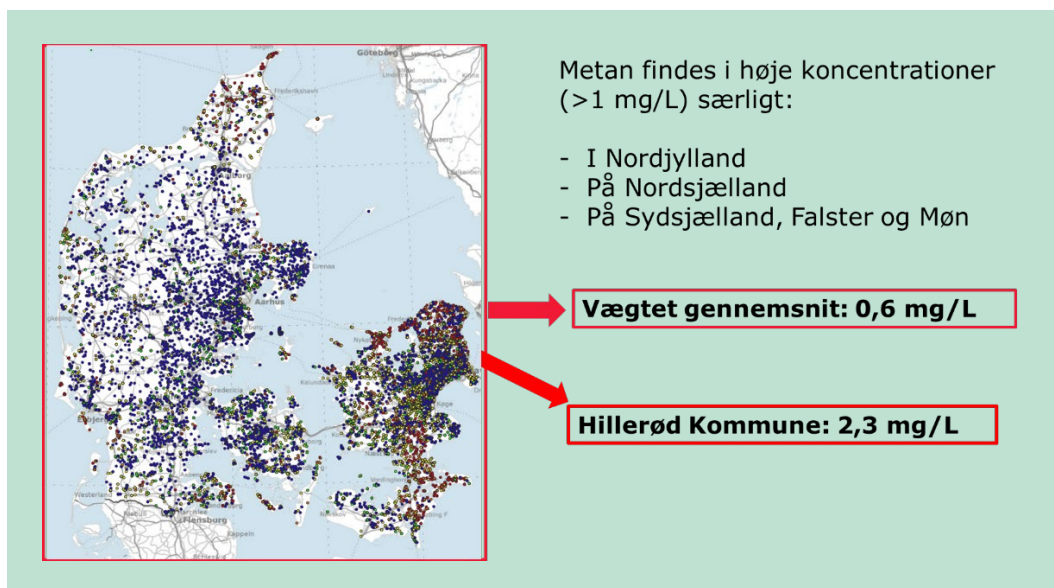
5. Forekomst af metan i grundvandet

5.1 Forekomst af metan i dansk grundvand

I Danmark og i mange andre EU-lande produceres drikkevand fra grundvand. Det iltfrie (anaerobe) grundvand indeholder store mængder af den specifikke drivhusgas metan. Metan i grundvandet stammer fra enten biogen (mikrobiel) nedbrydning af organiske forbindelser i dybere jordlag under iltfrie forhold eller termogene gasser, der frigives fra fossilt brændstof. Flere studier (fx Schloemer et al., 2018) har vist, at den største forekomst af metan i grundvand i Europa har biogen oprindelse.

I Danmark indvindes grundvand til drikkevandsproduktion hovedsageligt fra det iltfrie jordlag (ca. 50 meters dybde). Den årlige indvinding af grundvand til drikkevandsproduktion på vandværker udgjorde i 2018 ca. 418 millioner m³ (ref. Jupiterdatabasen, GEUS).

Ved identifikation og sammenligning i Jupiterdatabasen af alle aktive grundvandsboringer, som anvendes til drikkevandsproduktion (GEUS, anno 2020), viste det sig, at den gennemsnitlige koncentration af metan i grundvandet var ca. 0,6-0,8 mg metan/L. Forekomsten af metan i dansk grundvand er dog ikke jævnt fordelt over landet. Som illustreret i FIGUR 2, findes den højeste metankoncentration (>1 mg/L, rød markering) i grundvandet primært i Nordsjælland samt i Syd- og Nordjylland.



FIGUR 2. Geografisk forekomst af metan i Danmark i vandværkers aktive indvindingsboringer (Jupiterdatabase, GEUS). Blå markering (<1 mg/L), Rød markering (>1 mg/L).

De regionale forskelle i metanforekomsten i grundvandet direkte kombineret med forskellige mængder af indvundet grundvand imellem enkelte geografiske områder i Danmark (fx højeste indvinding i Københavnsområdet), betyder, at resultatet af et forsøg på en automatisk udregning af gennemsnitligt indhold af metan per liter indvundet grundvand ikke er fuldt repræsentativt. En mere nøjagtig (vægtet) udregning kom frem til et mere nøjagtigt vægtet gennemsnit af metanindhold per liter indvundet dansk grundvand til drikkevandsproduktion, som ligger på ca. 0,64 mg metan/L grundvand.

5.2 Forekomst af metan i grundvand i Europa og USA

Flere EU-lande producerer helt eller delvist drikkevand fra grundvand (fx Tyskland, Estland, Letland, Litauen, Polen, Holland, Belgien samt dele af Frankrig). Der findes meget lidt data om metan i grundvandet i EU-lande, men da grundvandet som tidligere nævnt er temmelig gammelt (>50 år) og iltfrit (anaerobt), er en gennemsnitlig metanmængde på 0,5-1,0 mg/L meget repræsentativ for grundvandet i EU og i resten af verden.

Der oppumpes årligt ca. 40 mia. m³ grundvand til drikkevandsproduktion i Europa (Eurostat, 2015), men qua grundvandets beskaffenhed (beskrevet ovenfor) forårsager oppumpning af vandet som minimum en metanudledning på ca. 17.500 tons/år, svarende til ca. 440.000 tons CO₂-ækvivalenter. Hertil skal lægges den mængde af grundvand, der anvendes i industrien, landbruget m.fl., hvorfor CO₂-aftrykket fra grundvand alene i EU forventes at ligge på ca. 1 mia. tons CO₂-ækvivalenter.

I USA er man som de første for alvorlig begyndt at undersøge dels forekomsten af metan i grundvandet, dels effekten heraf på miljøet. Den høje forekomst af metan i grundvandet i fx Pennsylvania (USA) blev rapporteret i 2011 (Osborn et al., 2011), hvor der blev konstateret meget høj forekomst af metan i 51 ud af 60 undersøgte drikkevandsboringer. Studiet viste også, at forekomsten af termogent metan (metan, der stammer fra fossilt brændstof) i grundvandet var højest ved grundvandsboringer, der var placeret i nærheden af olie- eller gasbrønde.

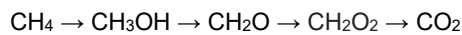
Et nyere studie (Kulongoski and McMahon, 2019) forsøgte at kvantificere den globale metanudledning, som er direkte forårsaget af indvinding af grundvand. Studiet konkluderede, at bidrag af metan fra indvundet grundvand svarer til 0,2 % af den globale metanudledning. Ved estimatet antog forfatterne, at ældre grundvand indeholder 0,44 mg metan/L, og at 80 % af det grundvand, der oppumpes globalt, indeholder samme mængde.

6. MetanOxiderende Bakterier (MOB'er): Vækstforhold og behov for sporstoffer

6.1 MOB's metan-monooxygenase-enzym (MMO)

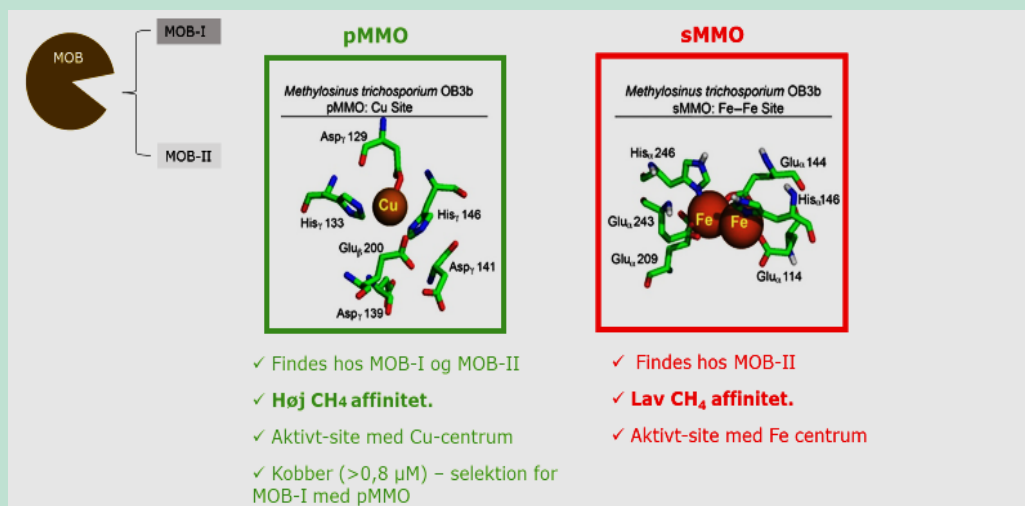
De naturlige metanoxiderende bakterier (MOB) er vidt spredt i naturen og findes i både terrestriske og akvatiske økosystemer, ligesom bakterierne kan være aktive selv ved meget lave temperaturer (3° C).

MOB'er kan under anaerobe forhold bruge metan (CH₄) som kulstofkilde og omdanne metan til CO₂. MOB'er anvender enzymet metan-monooxygenase (MMO), som omdanner CH₄ til metanol (CH₃OH), som herfra videreomdannes i cellen til CO₂.



MOB'er opdeles i to grupper (MOB-I og MOB-II); begge grupper anvender enzymet metan-monooxygenase (MMO) til metanomdannelse (Hanson and Hanson, 1996). Alle metanogene bakterier fra MOB-I- og MOB-II-grupperne er i stand til at producere den mest effektive form af MMO-enzymet, den såkaldt partikulære (membranbundne) MMO (ref. pMMO). Dette forudsætter dog tilstedeværelse af rigeligt kobber i omgivelserne (Cu >0,8 uM). Afhængigheden af kobber skyldes pMMO-enzymets natur, hvor det aktive centrum af enzymet bærer på tre kobbermolekyler (FIGUR 3).

Ved manglende tilgængelighed af kobber i omgivelserne vil kun bakterier fra MOB-II-gruppen være i stand til at producere en anden form af MMO-enzymet, den såkaldt soluble (opløselige) MMO (sMMO), som bærer jernmolekyler i enzymets aktive centrum (FIGUR 3). sMMO-enzymet har meget lavere affinitet over for metan end pMMO-formen. Det betyder i praksis, at sMMO-formen af enzymet ikke effektivt vil kunne fange og reducere metan i de miljøer, hvor metankoncentrationen er lav.



FIGUR 3. Opbygningen af de naturligt forekommende former af metan-monooxygenase-enzymet (MMO) hos MOB'er: den partikulære (pMMO) og den soluble (opløselige) form (sMMO). Kobber og jern i enzymets centrum er vist i brune cirkler.

Flere studier har vist, at molybdæn ligeledes kan spille en betydelig rolle i strukturen af de enzymer, der optræder i de sidste trin af MOB'ers metanbrydning, nemlig omdannelse af CH₂O₂-CO₂ (Jollie and Lipscomb, 1991; Ward et al., 2004 m.fl.). Derudover har fx Hakemian et al., 2008 observeret, at zink også kan have en rolle i enzymets struktur som en fast del i den aktive del af pMMO-enzymet. Zink i større mængder hæmmer dog pMMO-aktiviteten (Sirajuddin et al., 2014).

Enzymet sMMO, som produceres ved manglende tilgængelighed af kobber i omgivelserne, er mindre substratspecifik og derved også i stand til at oxidere chlorerede carbonhydrider og aromatiske carbonhydrider. Metanoxiderende bakterier viste sig uspecifikt at kunne omsætte (co-metabolsk) forbindelser såsom pesticidet 1,2,4-triazole (Wu, et al., 2016).

MOB'ernes mulige, co-metabolske egenskaber gør dem meget værdifulde, ikke kun for nærværende BioBox-projekt, men også til fremtidig rensning (bioremediering) af vand og jord, der er forurenet med rester af bestemte pesticider.

6.2 Identificering af sandfiltre med høj forekomst af MOB'er

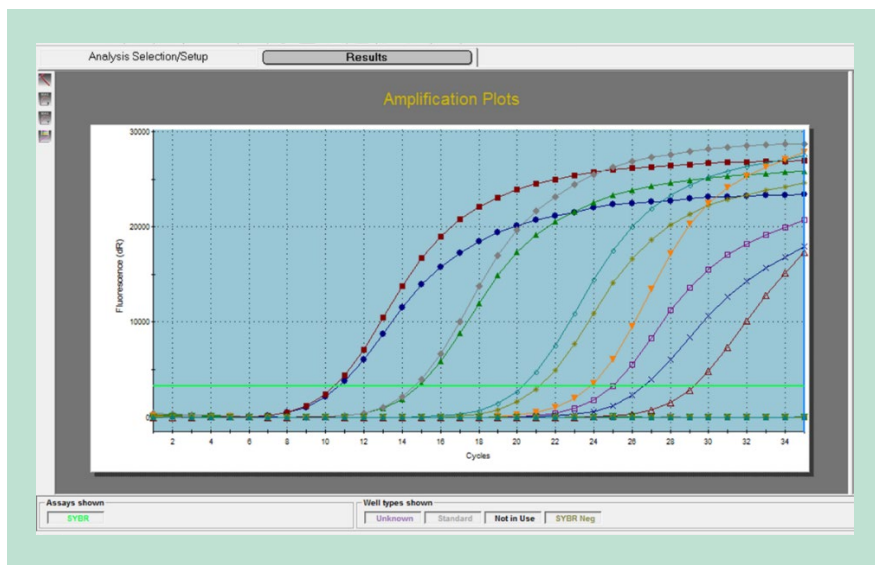
For at udvikle en BioBox-teknologi var det afgørende at identificere danske vandværker, hvor de naturlige MOB'er trivedes godt i eksisterende sandfiltre og desuden forekom i betydelige mængder.

I projektet anvendes den molekylære qPCR-analyse til kvantitativ identificering af MOB'er i sandet fra de udvalgte sandfiltre. qPCR-analysen kvantificerer mængden af pmoA-gener i en prøve. Idet alle MOB'er bærer et pmoA-gen på kromosomet, kan antallet af de kvantificerede pmoA-gen-kopier i en prøve omregnes direkte til antallet af MOB'er i prøven.

6.2.1 Arbejdsgangen

Et af de traditionelt anvendte primersæt til identifikation af MOB'er er primersæt A189/A682 (Holmes, 1995). Et nyere primersæt A189/mb661 (Costello, 1999) viste sig dog at have en fordel, idet primersæt A189/A682 delvist og uspecifikt kan fange visse former af det bakterielle amoA-gen, som ikke findes i MOB'er, men som er specifikke for ammoniumoxiderende bakterier, AOB (Costello, 1999). I projektet blev begge primersæt testet i starten, hvorefter primersæt A189/mb661 blev valgt.

Friskt sand fra sandfiltre på tre vandværker i Hillerød og Horsens (projekt partnere) samt Hjørring (frivilligt) blev opsamlet fra overfladen og sendt til Teknologisk Institut i Aarhus, hvor DNA blev ekstraheret ved hjælp af MP Biomedicals™ FastDNA Spin Kit til jord (Thermo Fischer) iflg. producenternes protokol. DNA blev opsamlet og opbevaret ved -20° C inden qPCR-analyse. DNA-koncentration blev målt ved hjælp af NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher). Standardkurven til qPCR-analysen blev udført på Teknologisk Institut i Aarhus. Den 507 bp lange del (amplicon) af pmoA-genet blev undersøgt i qPCR-reaktioner med primersæt A189F-mb661. Amplifikation blev udført ved 35 cyklusser efter protokol angivet af Castello et al., 1999 (FIGUR 4).



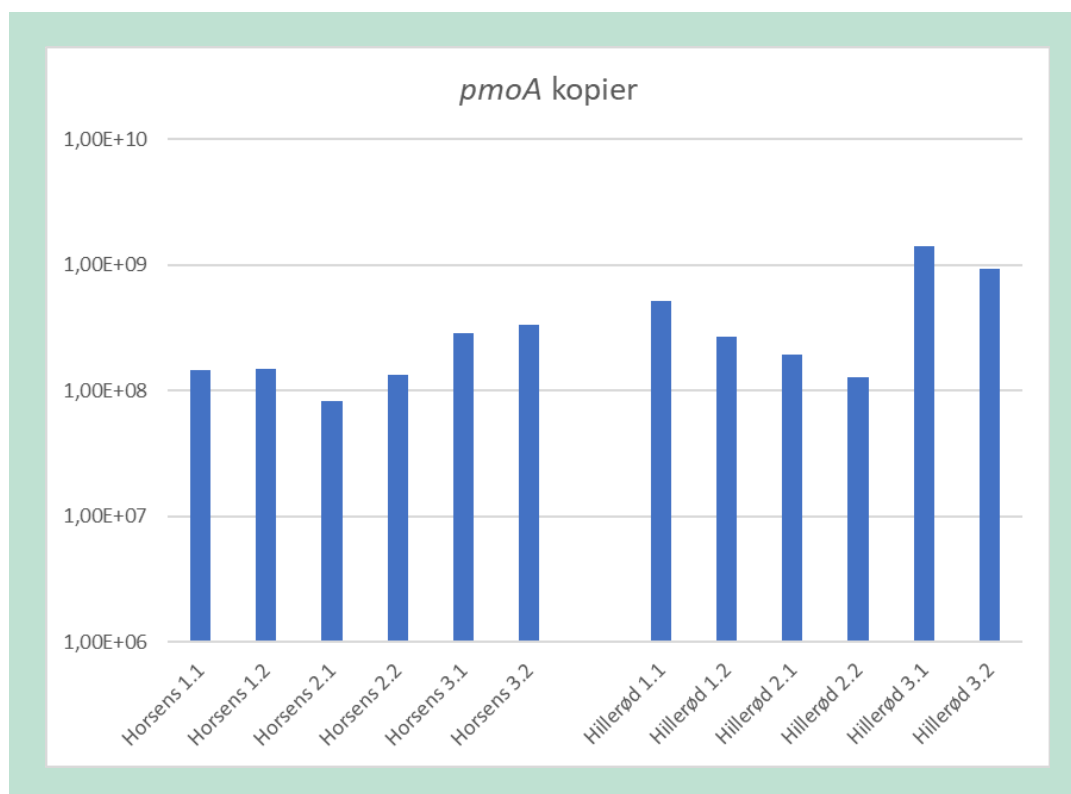
FIGUR 4. qPCR-standardkurve udført på kørsel med primersæt A189F-mb661 på pmoA-gen.

6.3 Resultater

qPCR-analyser udført på friskt filtersand fra Horsens og Hillerød vandværker viste en betydelig forekomst af MOB'er i begge sandfiltre. Antallet af MOB'er lå på hhv. ca. $2,5 \times 10^8$ MOB'er per gram filtersand i Horsens og ca. $8,5 \times 10^8$ MOB'er per gram filtersand i Hillerød (FIGUR 5). Til sammenligning viste det sig, at antallet af totale bakterier i disse sandfiltre (totale antal bakterier identificeret i et VUDP-forprojekt) lå på hhv. ca. 5×10^9 bakterier per gram filtersand i Horsens og ca. 1×10^{10} bakterier per gram filtersand i Hillerød. Det betyder, at MOB'er i gennemsnit udgør cirka 3-5 % og cirka 7-9 % af den totale bakterielle population på hhv. Horsens Vandværk og Hillerød Vandværk.

qPCR-analyser viste således både et tydeligt større antal af totale bakterier (VUDP-projekt) og et tydeligt større antal af MOB'er (nærværende projekt) i Hillerøds sandfiltre end i sandfiltre på Horsens Vandværk.

I praksis betød det, at man ved en standardiseret ekstraktion af levende bakterier fra friskt sand forventeligt ville kunne opsamle ca. 4-6 gange flere levende MOB'er af et gram sand fra Hillerød end af sand fra Horsens. Disse resultater var særdeles vigtige i det efterfølgende arbejde med inokulering af levende MOB'er fra sandfiltre på de testede matricer i laboratorie-, pilot- og fuldskalaforsøgene. Helt konkret betød det, at der som opstartsmateriale skulle anvendes min. 4 gange så meget friskt sand fra Horsens som fra Hillerød for at kunne forvente den samme mængde MOB'er i den vandige suspension (FIGUR 5) til inokulering af matricer i laboratorie-, pilot- og fuldskalaforsøg.



FIGUR 5. Antal identificerede MOB-celler per gram sand fra sandfiltre i Horsens og Hillerød. Der blev udtaget 3 prøver fra sandfiltre, og qPCR-analyse på hver prøve blev kørt i dupliketter.

7. Identificering af matrice til BioBox'en

7.1 Identificering af den bedste matrice til BioBox'en

For at udvikle en optimal BioBox, hvor de introducerede MOB'er fra naturlige sandfiltre kunne overleve og blive metabolisk aktive, var det nødvendigt igennem projektet at teste flere mulige matricer (materialer) i mikrokosmos i laboratorie- og pilotskala.

Den optimale, færdigudviklede filtreringsbioteknologi, BioBox, forventes at have en biofilteropbygning bestående af en understøttende matrice med et stort overfladeareal, som vil kunne understøtte etableringen af en bakteriel biofilm med MOB'er, samt en matrice, der vil sikre en høj interaktion imellem MOB'er i biofilmen og metan i den filtrerede udblæsningsluft.

En af de forventede udfordringer mht. metanreduktion i BioBox'en skyldes, at gasvæskelige-vægten (Henrys lov konstant) for metan er 28 (Schnabel et al., 2005), hvilket betyder, at metan har en lav opløselighed i vand, svarende til 24 g/m³. Da biofilmen i BioBox'en skal holdes fugtig for at kunne fungere optimalt (se nedenfor), vil det kunne udfordre den direkte kontakt mellem metan i den filtrerede udblæsningsluft og MOB'er på den fugtige matrice. En måde til at imødegå denne udfordring er at have det størst mulige overfladeareal i filteret, hvilket vil have en positiv effekt på masseoverførslen af metangas til væskefase.

Biofilmen på matricen i det udviklede filter til BioBox'en vil kræve næring for at holde sig aktivt. Med filtrering af luft fra iltningsrum på vandværker tilføres metan (CH₄) som kulstofkilde til MOB'er. For at holde sig metabolisk aktive skal MOB'er også have tilført nitrogen, fosfor og kalium (fællesbetegnet som NPK) samt visse sporstoffer i større eller mindre koncentrationer. Et af de vigtigste sporstoffer er kobber (Cu), som for MOB'er har afgørende betydning for nedbrydningen af metan, da kobber spiller en vigtig rolle i strukturen af pmoA-enzymet (FIGUR 3). Tilførsel af de nævnte stoffer skulle ske aktivt til den voksende biofilm på matricen og foregik i praksis helt simpelt med sprinklende hanevand i toppen af matricen for både at holde matricen fugtig og for at tilføre NPK og Cu til de voksende mikrober på matricen (se nedenfor).

7.2 Test af udvalgte materialer til BioBox'en i laboratorieskala

Udvælgelsen af det optimale materiale til BioBox'ens filtermatrice krævede flere eksperimenter med materialer, hvis egenskaber bl.a. skulle sikre en optimal biofilmdannelse og nem filtrering af udblæsningsluften fra vandværkernes iltningsrum.

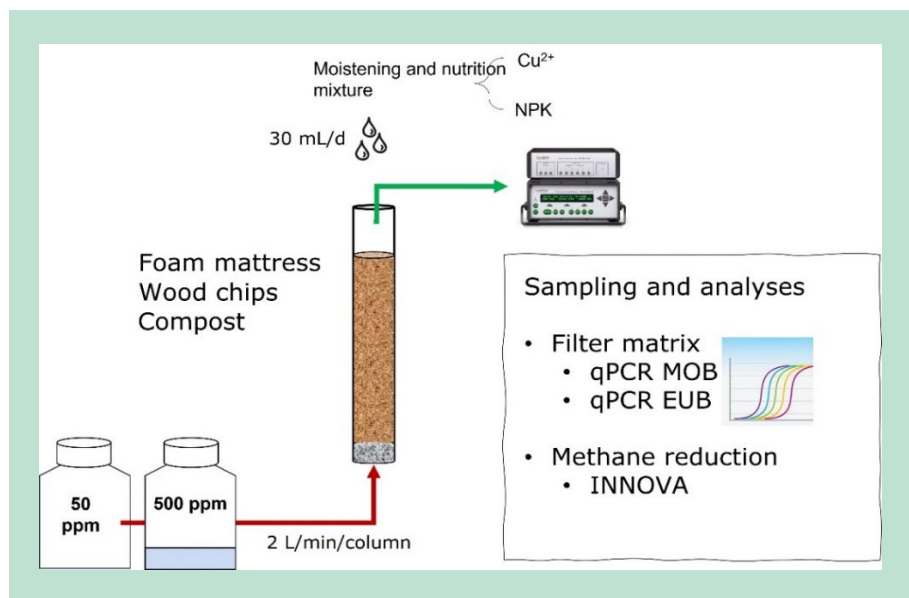
I første omgang blev der opstillet kolonneforsøg i laboratorieskala med 3 udvalgte materialer: skum, træflis og kompost. Skum materialet blev udtaget fra en almindelig børnemadras, b) træflis blev købt i et byggemarked, og c) kompost blev hentet fra Vejle Deponi. Skum og træflis blev udvalgt på baggrund af materialernes meget høje porøsitet og forholdsvis store overflader, som forventedes at ville sikre en høj biofilmdannelse og en høj interaktion mellem den filtrerede luft og bakterier i biofilmen. Kompostmateriale blev valgt på baggrund af flere danske forprojekter, hvor komposten med varierende succes var blevet afprøvet til reduktion af metangas fra lossepladser (Biocoverløsning, MST-2016).

Opstillingerne i laboratoriet bestod af plexiglasolonner med et af de udvalgte materialer (FIGUR 6). Kolonnerne, fyldt med enten skum, træflis eller kompost, blev inokuleret med levende sandfilterbakterier, som blev udvasket fra opsamlet, friskt sand fra sandfilter på Hillerød Vandværk. Filtersandet fra Hillerød blev valgt til laboratorieforsøg, fordi sandet egnede sig bedst

som MOB-inokulum ud fra de molekulære analyser, som kvantificerede forekomsten af MOB'er i de respektive sandfiltre (beskrevet ovenfor). Det bakterielle inokulum blev fremstillet ved at placere 500 g friskt filtersand og 2 L hanevand i en spand, efterfulgt af kraftig omrøring (150 rpm/24 timer). Herefter blev væskefasen (vand) opsamlet og anvendt som inokulum til forsøgene.

Analysen (qPCR) af væskefasen viste, at det totale antal bakterier i denne suspension var ca. $3,9 \times 10^{10}$ celler per ml. Analysen viste desuden, at andelen af MOB'er i væskefasen udgjorde $2,4 \times 10^9$. Resultaterne indikerede, at den procentmæssige andel i væskefasen var 6,1 %, hvilket stemmer godt overens med den tidligere observation, nemlig at andelen af MOB'er på Hillerøds filtersand ligger på 7-9 % af totale bakterier. Denne suspension med naturlige filtersandbakterier blev anvendt som inokulum til de testede materialer i kolonnerne på Dag 0. Antal af totale bakterier og MOB'er i kolonnerne blev monitoreret over de næste 60 dage.

Til kolonner med skum, træflis eller kompost blev metangas tilført fra bunden som en veldefineret blanding af rent metan og atmosfærisk luft. De testede metankoncentrationer i indløbsluften var 50 ppm og 500 ppm (parts per million). Metankoncentrationer blev valgt på baggrund af den forventede metangaskoncentration i udblæsningsluften hos danske vandværker med metanbelastet grundvand. Den atmosfæriske luft beriget med rent metan i de nævnte koncentrationer (50 ppm og 500 ppm) havde et flow på 2 L per minut (FIGUR 6).



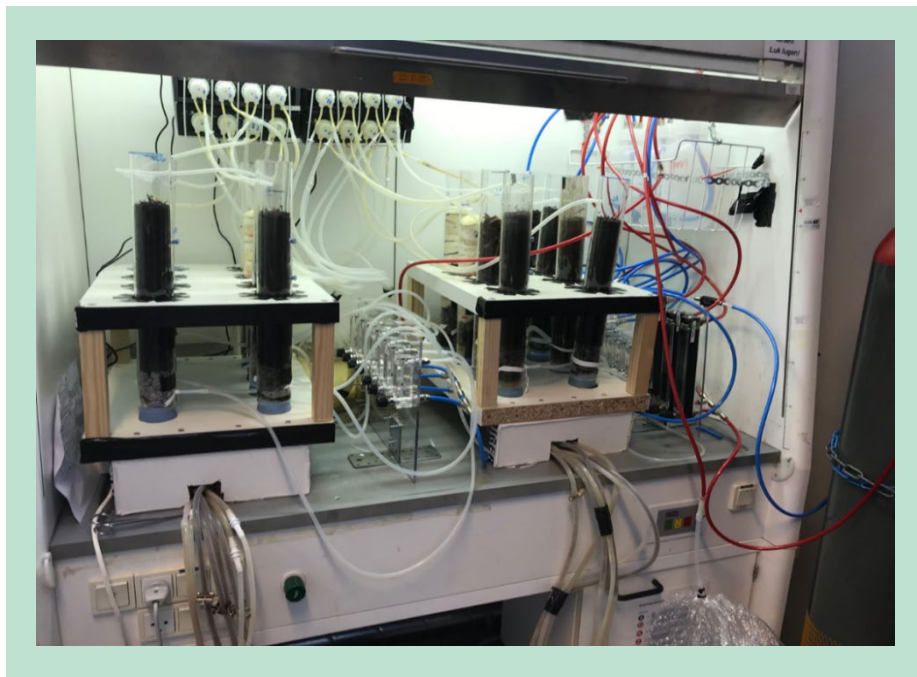
FIGUR 6. Diagram over laboratorietest af materialer ved kolonneforsøg med de valgte metankoncentrationer (50 og 500 ppm), de molekulære analyser for bestemmelse af totale bakterier og MOB'er over tid samt apparatur for måling af metan (Innova).

Fugtning af matrice ved periodisk dosering af små mængder vand i toppen af kolonnerne (30 ml, 2 gange per døgn) skulle sikre mod udtørring. Kun de fugtige matricer kunne understøtte den bakterielle aktivitet med henblik på metanreduktion. Vandet tilført fra toppen var samtidig beriget med meget små mængder af de kritiske sporstoffer, hhv. kobber (Cu , 1 $\mu\text{g/L}$) og NPK (10 g/L) for at sikre optimal overlevelse og aktivitet af især MOB'er på matricerne.

Kolonnerne blev kørt i duplikater for hver af de testede matricer (skum, træflis og kompost) og for hver testede metangaskoncentration (50 ppm, 500 ppm). Opstillingen var placeret i et stinkskab (FIGUR 7). Metankoncentrationen i ind- og udløbsluft blev automatisk målt over 5

minutter for hver kolonne med INNOVA-apparat (Innova Lab Instruments). Reduktion af metangas som følge af filtrering igennem kolonner med specifikke matrice- og sandfiltermikrober blev estimeret.

Som kontrolkolonner blev der opstillet kolonner med de relevante matricer inokuleret med sandfiltermikrober, som blev tilført atmosfærisk luft uden metan. Disse kontrolkolonner skulle undersøge overlevelsen af tilførte sandfiltermikrober med fokus på MOB'er ved tilførsel af luft uden metan. Prøver af modnende matricer blev kontinuerligt indsamlet over forsøgsperioden. Den mikrobielle masse blev vasket af med rent vand og herefter opkoncentreret ved centrifugering (10.000 rpm), og det bundfældede materiale fra prøverne blev brugt direkte til molekylær (qPCR) bestemmelse af det totale bakteriesamfund og mængden af de specifikke MOB'er.



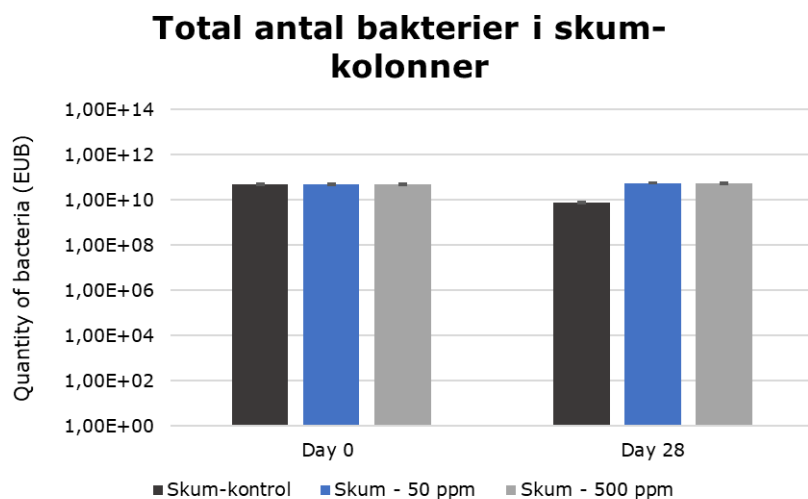
FIGUR 7. Opstilling af laboratoriekolonner i stinkskab i laboratorium. Teknologisk Institut, Aarhus.

7.2.1 Resultater fra kolonneforsøg i laboratorium med testede filtermatricer

Overordnet viste det sig, at en kontinuerlig strøm af metanholdig luft gennem kolonner med skum og træflis over en periode på 60 dage havde en væsentlig effekt på den stigende mængde af de specifikke MOB'er på de respektive materialer og havde en direkte positiv effekt på fjernelsen af metan fra luften (se nedenfor).

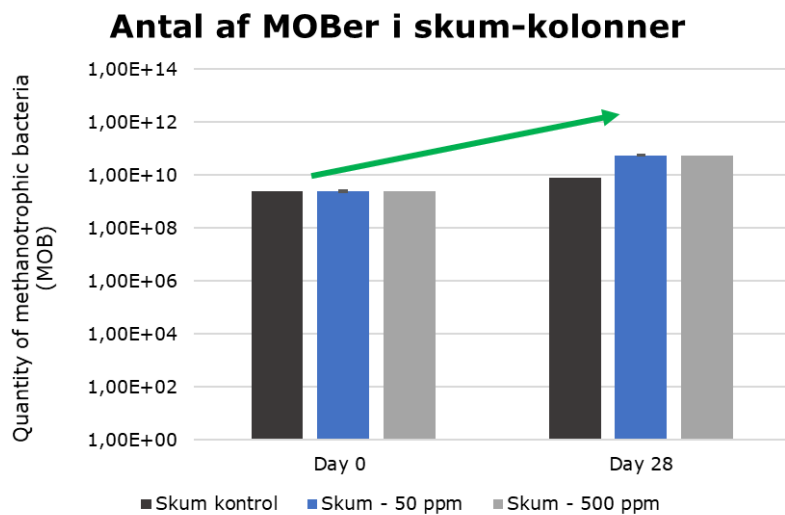
7.2.2 Kolonner med skummateriale

Resultaterne i kolonner med skum viste, at antallet af totale bakterier i kolonnerne, med eller uden tilført metangas (0 ppm, 50 ppm, 500 ppm), var stort set uændret over de første 4 uger (FIGUR 8). Kun i kontrolkolonnerne kunne der observeres et mindre antal totale bakterier (fra $4,8 \times 10^{10}$ celler til $7,5 \times 10^9$ celler/g, mens antallet af bakterier i kolonnerne med 50 ppm og 500 ppm forblev uændret ($4,8 \times 10^{10}$ - $5,3 \times 10^{10}$ celler/g).



FIGUR 8. Antal af alle (totale) bakterier i kolonner med skum ved opstarten og efter 28 dages kørsel. Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm med metan (50 ppm, 500 ppm) eller uden metan (kontrol).

Antallet af MOB'er i kolonner med skum steg betydeligt over de første 4 uger. I kontrolkolonnerne steg antallet af MOB'er i mindre grad, fra $2,5 \times 10^9$ celler/g til $7,5 \times 10^9$ celler/g (en faktor 3) (FIGUR 9), mens antallet af bakterier i kontrolkolonnerne forblev uændret (FIGUR 8). I kolonner med 50 ppm eller 500 ppm metan steg antallet af MOB'er betydeligt (en faktor 15), helt konkret fra $3,2 \times 10^{10}$ celler/g til $4,6 \times 10^{11}$ celler/g (FIGUR 9).

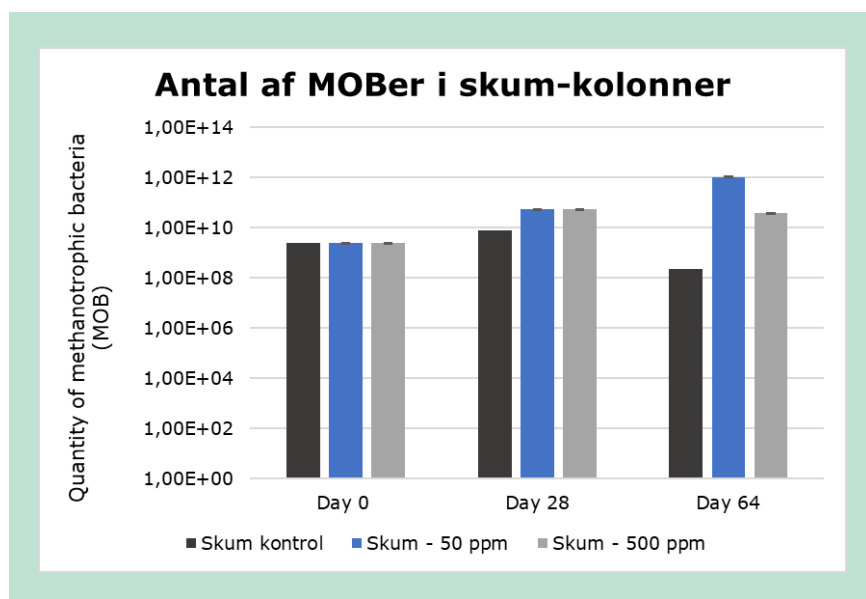


FIGUR 9. Antal MOB'er i kolonner med skum ved opstarten og efter 28 dages kørsel.

Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm med metan (50 ppm, 500 ppm) eller uden metan (kontrol).

I de efterfølgende 36 dage (Dag 28 til Dag 64) steg antallet af MOB'er i kolonner med skum voldsomt. I kolonner med skum, der blev tilført 50 ppm metan, steg antallet af MOB'er fra hhv. $2,5 \times 10^9$ celler/g (Dag 0) til $1,0 \times 10^{12}$ svarende til >400 gange i forhold til opstartsmængden

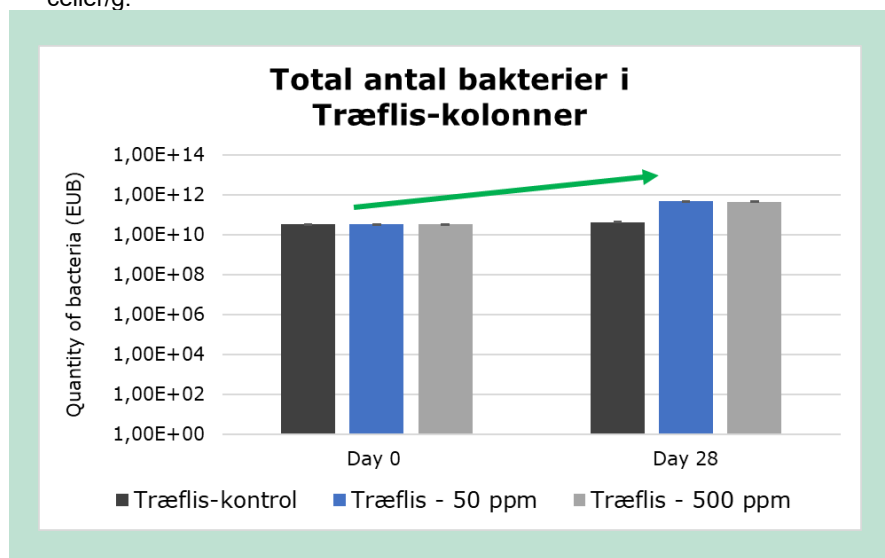
(FIGUR 10). Den voldsomme stigning i mængden af MOB'er gjorde skummet til en meget lovende kandidat som BioBox-matrice.



FIGUR 10. Antal MOB'er i kolonner med skum ved opstarten, ved Dag 28 og efter Dag 64. Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm (2 L/h) beriget med metan (50 ppm og 500 ppm) eller uden metan (kontrol).

7.2.3 Kolonner med træflis

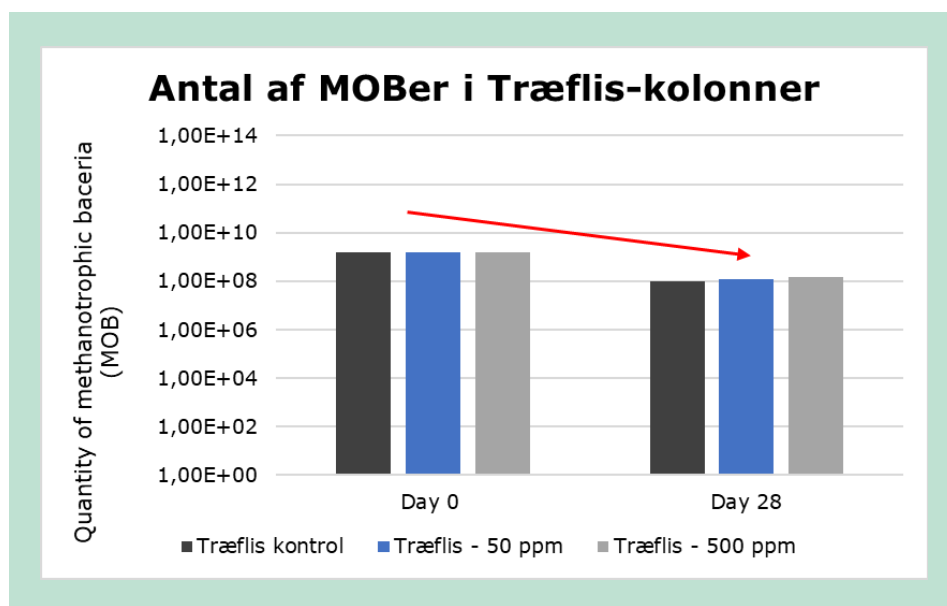
Antallet af totale bakterier i kolonnerne med træflis steg over de første 4 uger i forhold til opstarten (FIGUR 11). Mens antallet af totale bakterier i kontrolkolonnerne forblev stort set uændret over 4 uger ($3,2 \times 10^{10}$ - $4,1 \times 10^{10}$ celler/g), steg antallet af totale bakterier i kolonnerne tilført enten 50 ppm eller 500 ppm metangas 15 gange, fra $3,2 \times 10^{10}$ celler/g op til $4,8 \times 10^{11}$ celler/g.



FIGUR 11. Antal (totale) bakterier i kolonner med træflis ved opstarten og efter de første 4 ugers kørsel. Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm uden metan (kontrol) og med metan (50 ppm og 500 ppm).

Denne voldsomme stigning i antallet af alle (totale) bakterier i kolonnerne med træflis tilført metanholdig luft betød desværre ikke en tilsvarende stigning i antallet af MOB'er. Tværtimod. Trods en 15-foldstigning i antallet bakterier blev der konstateret et ikke forventet fald i mængden af MOB'er i kolonner med træflis (FIGUR 12). Helt konkret faldt antallet af MOB'er fra 1,6

$\times 10^9$ celler/g til $1,2 \times 10^8$ celler/g over 4 uger. Antallet af totale bakterier og MOB'er i kolonner med træflis forblev uændret over de næste 36 dage (Dag 28 – Dag 64, data ikke vist). Denne observation med faldende mængde af MOB'er over tid, som stabiliserede sig på et niveau svarende til 10 % af opstarten (ref. 1×10^9 til 1×10^8), gjorde træflis til en ikke-optimal kandidat som BioBox-matrice.



FIGUR 12. Antal MOB'er i kolonner med træflis ved opstarten og efter 28 dages kørsel. Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm med metan (50 ppm, 500 ppm) eller uden metan (kontrol).

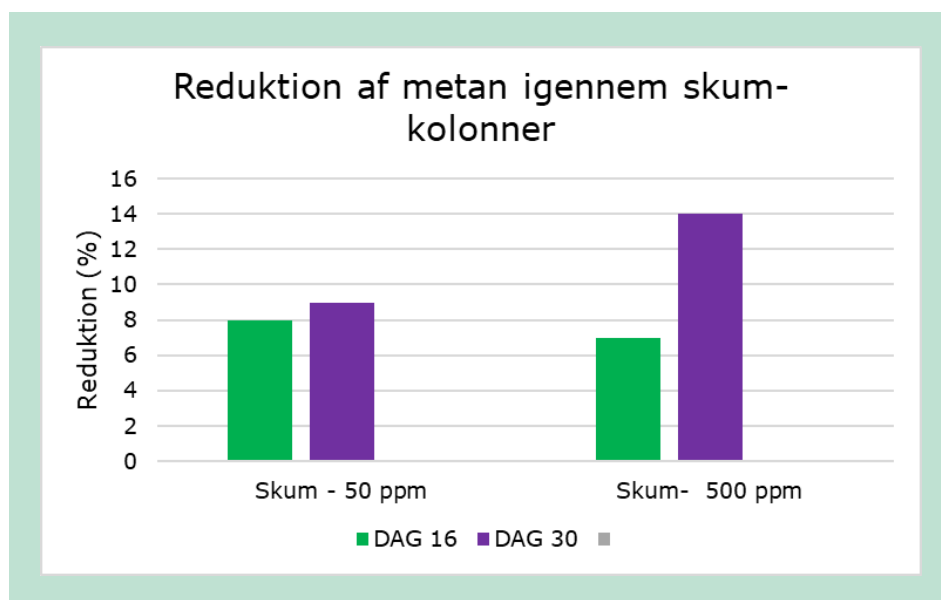
7.2.4 Kolonner med kompostmateriale

Kolonner med modnende kompost fra Vejle viste sig desværre at være meget udfordrende i laboratoriet. Mange tilstopninger af luftstrømmen og tilpasninger under kørsel gjorde det umuligt at sammenligne de opnåede resultater med resultater fra de øvrige kolonner (skum, træflis). Derfor blev kolonner med kompost stoppet halvvejs under forsøgene. Anvendeligheden af de naturlige MOB'er, som det fra starten forventedes at kunne finde i komposten, blev testet i pilotskalafor søg (se nedenfor).

7.2.5 Reduktion af metan i laboratoriekolonner med skum eller træflis

Resultater fra de molekulære analyser, der monitorerede mængden af totale bakterier og MOB'er i kolonnerne med skum eller træflis over tid blev sammenlignet med de målte koncentrationer af metan både i indblæsnings- og udblæsningsluft (INNOVA-apparat).

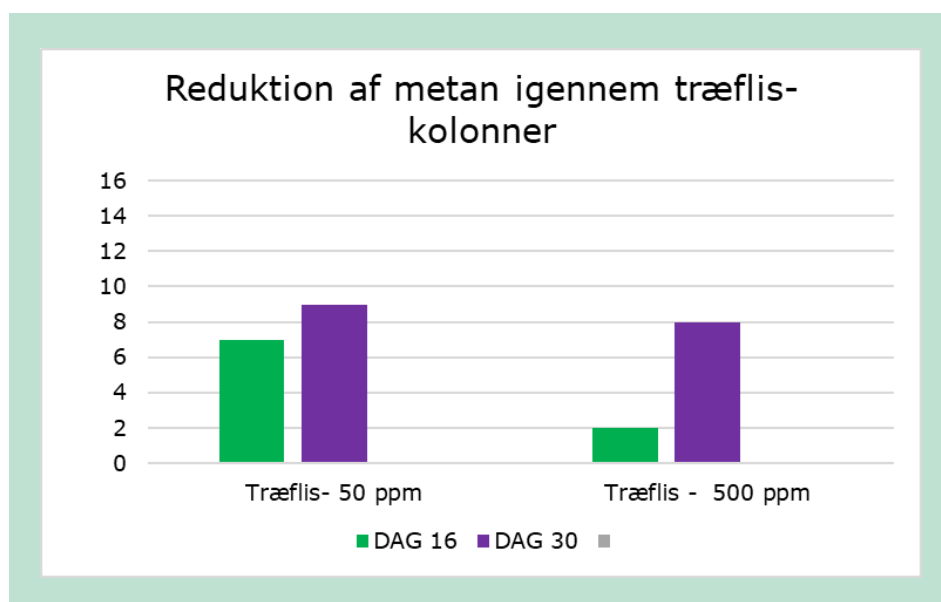
I kolonner med skum, der håndterede luft med enten 50 ppm eller 500 ppm metan, viste INNOVA-målinger, at mikroberne i begge tilfælde kunne fjerne ca. 8 % af metanet fra indblæsningsluften efter 16 dage (FIGUR 13), uanset om luften indeholdt 50 ppm eller 500 ppm metan. Metanreduktionen steg yderligere over de næste 2 uger i begge kolonner. På Dag 30 viste INNOVA-målinger, at kolonnen med skum, der blev tilført 500 ppm metan i indblæsningsluften kunne fjerne hele 14 % af metanet, mens kolonnen med skum med 50 ppm metan i indblæsningsluften fortsat fjernede ca. 7 % af metanet (FIGUR 13).



FIGUR 13. Reduktion af metan fra indblæsningsluften igennem kolonner med skum. Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm med 50 ppm eller 500 ppm metan.

I kolonner med træflis, der håndterede luft med enten 50 ppm eller 500 ppm metan, viste IN-NOVA-målinger en lignende metanreduktion på 8 % i forhold til metan i indblæsningsluften, dog først efter 30 dage.

Efter de første 16 dage lå metanreduktionen på cirka 7 % og 2 % for hhv. kolonner med 50 ppm og 500 ppm metan i indblæsningsluften (FIGUR 14). Metanreduktionen steg over de næste 2 uger; mest i kolonner med 500 ppm metan, fra ca. 2 % (Dag 16) til ca. 8 % (Dag 30), mens reduktionen steg fra ca. 7 % til ca. 9 % i kolonner med 50 ppm metan (FIGUR 14).



FIGUR 14. Reduktion af metan fra indblæsningsluften igennem kolonner med træflis. Igennem kolonnerne blev der sendt en luftstrøm med 50 ppm eller 500 ppm metan.

7.2.6 Opsummering af kolonneforsøg i laboratorieskala

Kolonneforsøgene i laboratoriet viste entydigt, at skummateriale var det bedste kandidatmateriale til en matrice til BioBox'en. Skum materialet performede bedst med hensyn til både overlevelse og aktivitet af MOB'er.

De molekylære analyser viste, at antallet af MOB'er i kolonner med skum, der blev tilført luft med 50 ppm metan, steg hele 400 gange på Dag 64 i forhold til opstarten. Til sammenligning faldt antallet af MOB'er i kolonner med træflis 10 gange i forhold til opstarten.

Målinger af metan i luftfasen før og efter kolonner viste også, at den største reduktion af metan fra indblæsningsluft blev målt i netop de kolonner med skum, der blev tilført 50 ppm metan, og som havde en voldsomt stigende mængde af MOB'er. I disse kolonner lå metanreduktionen på 14 % på Dag 30. Til sammenligning lå den største målte metanreduktion i kolonner med træflis på 9 % (Dag 30) i kolonner, der blev tilført 50 ppm metan med indblæsningsluft.

7.2.7 Kolonneforsøg i pilotskala

Grundet Coronapandemien i sommeren-efteråret 2020 blev det besluttet at køre pilotskalaforsøgene i laboratoriet og tilpasse forsøgene bedst muligt de forhold, som er gældende på vandværker. Laboratorieforsøgene viste tydeligt, at skum (børnemadras) var den absolut bedste matrice blandt de 3 testede materialer. Derfor blev skum (børnemadras) valgt som matrice til det videre arbejde.

7.2.8 Opstilling af pilotskalakolonner

Kolonner (110 mm i diameter, 1.000 mm i højden) blev anvendt til opstillingen (FIGUR 15). Luft beriget med metan (50 ppm) blev tilført (10 L/time) med en slange i bunden af kolonnerne, hvor et 100 mm stenlag sikrede metanets jævne fordeling op igennem skumlaget. Hver kolonne indeholdt 7 skumlag (FIGUR 16) skåret til 120 mm i diameter. Den 10 mm større diameter på skumlagene end den indre diameter af kolonnerne skulle sikre, at den metanholdige luft ikke løb langs kanterne af kolonnerne uden kontakt med mikroberne i skummatricen.



FIGUR 15. Opstilling af semitekniske kolonneforsøg i pilotskala i laboratorium. Atmosfærisk luft blandes med rent metan (flasken) for at danne en blanding med 50 ppm metan, som pumpes til bunden af hver kolonne. Metanreduktion måles med INNOVA i luftfasen over skumlagene. Vandpumpe tilfører periodisk vand (50 ml) med NPK og kobber (beskrevet ovenfor).

7.2.9 Inokulering af pilotskalakolonner

Den ene pilotskalakolonne blev inokuleret med de mikrober, der var vasket fra friskt filtersand fra Hillerød, mens den anden kolonne blev inokuleret med de mikrober, der var vasket fra kompost (Vejle Deponi). Forsøg med mikroberne fra kompost blev udført af to årsager: a) kompostforsøg lykkedes ikke i kolonnerne laboratorieskala, og der var ikke tid til at gentage forsøget, og b) moden kompost indeholder naturligt MOB'er i betydelige mængder (5×10^7 MOB'er/gram).

Inokuleringsprocessen bestod i, at hvert skumlag enkeltvis blev tilført ca. 100 ml bakteriesuspension ($\sim 10^9$ totale celler per ml) før skumlagets indsætning i kolonne. For at holde kolonnen fugtig, blev der hver time fra toppen tilført ca. 50 ml væske indeholdende 1 mg NPK/ ml (kunstig gødning) og 5 ug kobber/L. De små mængder af overskydende væske i bunden af kolonnen fjernes med dræn eller en pumpe (FIGUR 15).

Forsøget køres over 140 dage, og prøver af skummateriale og væske udtages på dagene 30, 60 og 140. Ved prøvetagningen opsamles både et stykke skumprøve (FIGUR 16) og en væskeprøve fra relevante skumstykker (lag). Skumprøver udtages ved at skæres ca. 1 cm^2 fra undersiden af hvert lag (FIGUR 16), mens vandprøver udtages ved, at væsken presses ud af det udtagne skumlag. På vandprøver køres molekylær qPCR for bestemmelse af antal af totale bakterier samt ammoniumoxiderende bakterier (AOB'er) og metanoxiderende bakterier (MOB'er). Skumprøverne fra lag 1 og 7 (top, bund) analyseres på samme vis.



FIGUR 16. De periodisk opsamlede skumlag fra kørende pilotskalakolonner i laboratorium. Antal bakterier (totale, MOB'er, AOB'er) i skumlagene måles både i væsken fra skumlagene og i skumaterialet fra de drænede skumlag.

7.2.10 Opsummering af kolonneforsøg pilotskala

Kolonneforsøg i pilotskala viste, at kolonner med skum med mikrober fra både friskt sand og kompost kunne reducere metan i indblæsningsluften.

Det mikrobielle samfund viste sig at være stabilt. De molekulære analyser viste, at antallet af totale bakterier målt i starten var relativt høj, ca. 7×10^{10} celler per ml væske drænet fra skumlagene og ca. 6×10^9 per gram drænet skum.

De molekulære analyser viste, at MOB-samfundet var veletableret og relativt stabilt i de undersøgte skumlag, allerede efter de første 30 dage, men med en svagt stigende tendens frem til Dag 60. På Dag 30 var der ca. 9×10^6 MOB'er i væsken (ml) fra skumlagene og ca. 4×10^6 MOB'er per gram drænet skum. Der var ens forekomst af MOB'er igennem alle 7 skumlag i kolonnerne.

Metanmålingerne over kolonnerne viste en relativt høj metanreducerende effekt igennem kolonnerne. Den største reduktion kunne observeres igennem kolonnen med skum beriget med mikrober fra sandfilter. Her blev metan reduceret fra 100 ppm til 35 ppm (65 %).

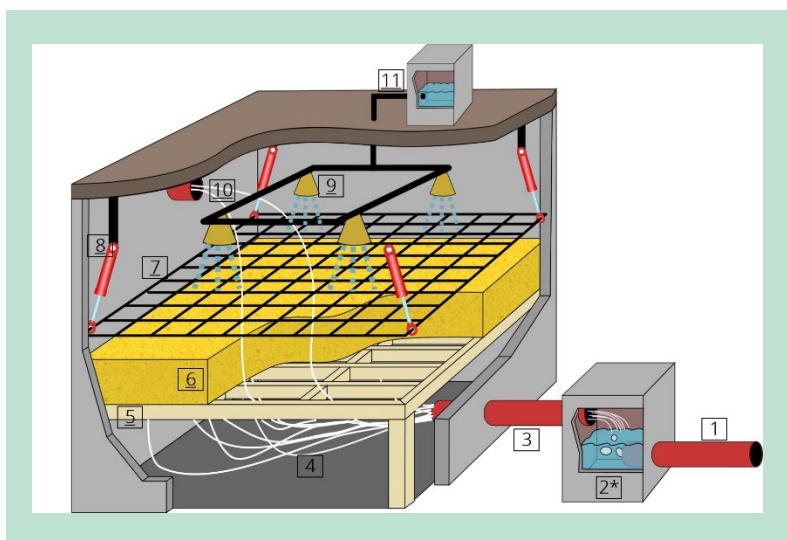
I kolonnerne i pilotskala blev der desuden undersøgt for ammoniumoxiderende bakterier (AOB'er). Denne test skulle undersøge, om andre mikrobielle grupper såsom AOB'er eventuelt ville kunne udkonkurrere de ønskede MOB'er om pladsen på matricen i BioBox'en. AOB'er blev valgt til analysen, da flere videnskabelige artikler har peget på muligheden af, at AOB'er til en vis grad også kan omsætte metan med enzymet amoA, som iflg. litteraturen er relativt nærtbeslægtet med MOB'ers enzym pmoA (Tavormina et al., 2011). Det skal nævnes, at det fortsat er uvist, i hvor høj grad AOB'er kan få tilstrækkelig energi ud af den metanreducerende proces. Analysen af AOB'er viste, at mængden af AOB'er også var stabil over 60 dage. AOB-niveauet lå fra starten på ca. 9×10^8 AOB'er i væsken fra skumlagene og ca. 8×10^7 MOB'er per gram drænet skum.

Den relativt store andel af AOB'er skyldes sandsynligvis tilførsel af den kommercielle NPK-gødning, som indeholdt ammonium, og som kunne bruges af AOB'er. Trods denne direkte tilførsel af kvælstof til AOB'er via NPK-gødning kunne AOB'er ikke udkonkurrere MOB'er. Tilførsel af NPK-gødning blev stoppet halvvejs i forsøgende uden at påvirke metanreduktionen, hvilket tyder på, at MOB'erne behøver NPK i meget lave mængder til en normal funktion.

For at minimere MOB'ers konkurrence om pladsen overfor AOB'er, som kan bruge kvælstof direkte fra den kommercielle NPK-gødning, valgte gruppen at bruge 100x mindre NPK efterfølgende samt N,P,K-salte i renere form fra Sigma Aldrich (K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$).

7.2.11 BioBox i semiteknisk fuldskala i Hillerød

Dimensionering af BioBox'en i en fuldskalaopstilling blev udarbejdet i tæt samarbejde med projektpartneren. Den oprindelige plan var, at fuldskalaopstillingen skulle have følgende dimensioner: H:150-200 cm og B:100-150 cm. De vigtigste parametre til BioBox'en blev identificeret og groft skitseret (FIGUR 17).



FIGUR 17. Illustration af BioBox'en på et vandværk. De enkelte punkter er beskrevet i teksten.

Efter planen skulle en velfungerende BioBox omfatte følgende parametre:

1. Indløbsluft, som kobles direkte på den eksisterende udblæsningsventilator på vandværket
2. H₂S-fælde. Høj koncentration af H₂S i luften kan påvirke mikrobiologien i matricen. En simpel løsning kunne være en tønde med vand indeholdende fx zinkacetat. Zinkacetat fanger selektivt H₂S, der kunne forekomme i luften, og udfælder den til uopløseligt zinksulfid
3. Indblæsningsluft til filteret, som er H₂S-reduceret
4. Jævn fordeling af indblæsningsluft under bærelag
5. Bærelag, tykkere metalnet, der holder skum ca. 10-20 cm over bunden
6. Skumlag
7. Metalnet, som periodisk presses over skummet og renser (dræner) skummet for urenheder
8. Bærearm til metalnet over skummet (biofilteret)
9. Dyser, som periodisk doserer vandet med NPK og kobber
10. Udblæsningsluft, som forventes at være metanreduceret
11. Sporstofbeholder (NPK, Cu).

7.2.12 Opstilling af BioBox'en i Hillerød

Den første fuldskalaopstilling blev konstrueret på Stenholtværket i Hillerød. I den forbindelse kom partnernes bæredygtige syn til udtryk. BioBox'en i fuldskala blev således bygget af partnerne fra Hillerød Vand og Kemic Vandrens, hovedsageligt af genbrugt materiale. En skrottet metalmælkebeholder (bunden) samt en bøjet metalplade (toppen) blev anvendt med talrige udbedringer. Det endelige produkt skulle imødekomme de nævnte parametre og skulle desuden omfatte et plexiglasvindue for at kunne observere BioBox'en indvendigt (FIGUR 18).



FIGUR 18. Opbygning af BioBox'en i fuldskala på Stenholtværket i Hillerød. Metalnettet blev konstrueret for at fastholde matricen i BioBox'en. Den gule tønde indeholdt vand beriget med NPK og kobber. Blå tønde (sort låg) med zinkacetat anvendtes til udfældning af H_2S fra luften.

7.2.13 Inokulering af BioBox'ens skummatrice

For at fremstille et inokulum til BioBox'en i fuldskala blev der i en spand med ca. 30 L vand tilsat 10 kg friskt sand fra de kørende sandfiltre på vandværket. Ved hjælp af boremaskine og pisker (FIGUR 19, A) blev de levende sandfiltermikrober vasket fra sandet over til vandfasen. Denne suspension blev filteret igennem en sigte (500 μm) for at fjerne evt. store partikler. Suspension blev hældt over de enkelte skumlag med det formål at inokulere skummet (FIGUR 19, B og C). Der blev i alt lagt 3 lag af skum, hvert 7 cm tykt, så det samlede skumlag var 21 cm.



FIGUR 19. Inokulering af skumlagene i BioBox'en i fuldskala (se teksten nedenfor).

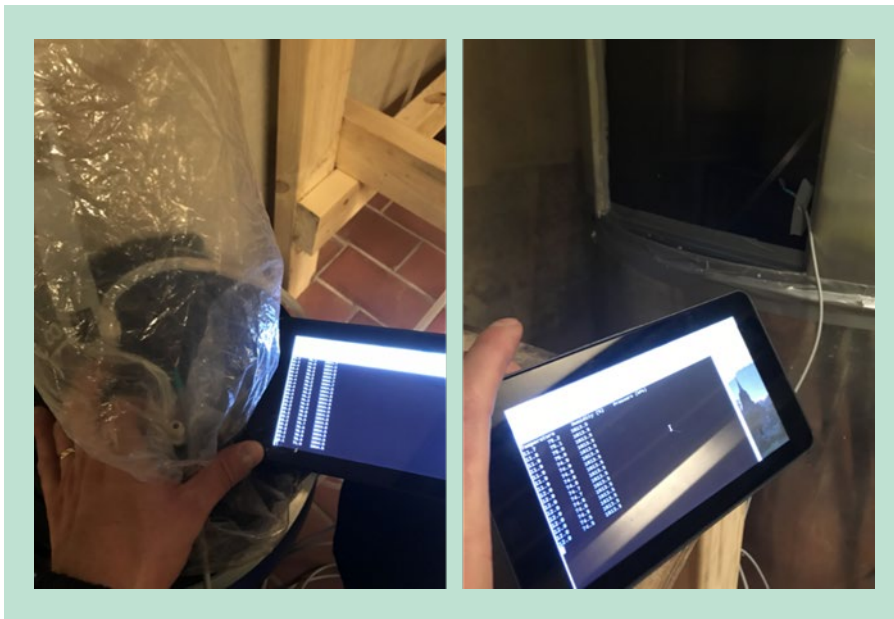
For at sikre en skånsom opstart af BioBox'ens biofilter, hvor de tilførte sandfiltermikrober skal have mulighed for at vænne sig til de nye omgivelser, som består i en skummatrice, blev der i opstarten under skumlagene lagt en vandtæt plastikfolie. Folien skulle over de første 3-4 dage hjælpe sandfiltermikroberne med at danne kontakt og indlede en kolonisering af den nye skummatriceoverflade i BioBox'en, før de overhovedet blev udsat for de valgte testparametre i en kørende BioBox. Efter en periode på 3-4 dage blev plastikfolien fjernet, og luften indeholdende naturligt metan blev kørt igennem BioBox'en med et flow på ca. 8 m³/time.

Det var også vigtigt at rengøre skummet for urenheder, som kunne true skummets porøsitet og funktion (fx voksende biofilm). Et metalnet, som periodisk skulle presses over skummet og rense (dræne) skumlagene i BioBox'en, blev placeret lige over skumlaget (FIGUR 20, A). Da metanholdig luft tilføres fra bunden, var det vigtigt hver time at fugte matricen med tilsætning af vandsuspension indeholdende kobber og NPK. Igennem 4 silikoneslanger blev der hver time doseret sammenlagt 240 ml vand med NPK og Cu (FIGUR 20, B).



FIGUR 20. BioBox'en indefra. A) Metalnet til periodisk rensning (pres-og-slip) af skumlaget placeret over skum. B) BioBox'en holdes fugtigt ved dosering af vand hver time med NPK og Cu.

Fugtigheden i BioBox'en, som er afgørende for overlevelsen af især sandfiltermikrober, blev monitoreret løbende, både i indløbsluften (luften efter H₂S-fælden) og inde i selve BioBox'en lige over skumlaget (den filtrerede luft). Fugtigheden blev målt til ca. 70 % af luftens mætningspotentiale, hvilket var passende for at sikre god velfærd for mikroberne og for at forhindre udtørring af skumlagene.



FIGUR 21. Fugtighed blev monitoreret i luften, der efter tønden med H_2S -fælden blev sendt til bunden af BioBox'en (venstre), og inde i selve BioBox'en over skumlagene (højre).

7.2.14 Fjernelse af metangas i vandværkets udblæsningsluft

Fjernelse af metan fra vandværkets udblæsningsluft blev fulgt med løbende målinger af metan i luften flere steder omkring BioBox'en. De løbende målinger af metan blev foretaget hver 3.-4. dag i perioden på 83 dage. Hver gang blev der foretaget målinger på følgende steder: a) i den meget metanholdige luft fra iltningsskålen på vandværket (koblet til BioBox'en), b) i indløbsluften lige før BioBox'en, dog efter H_2S -fælden, og c) i luften i BioBox'en, lige over skumlaget (FIGUR 22).



FIGUR 22. Måling af metanindhold i luften på de udvalgte steder. Iltningsbassin på vandværket (venstre), indløbsluft til BioBox'en efter H_2S -fælden (midten) og over skumlagene i BioBox'en (højre). Alle målingerne viste betydelig fjernelse (>50 %) af metan i BioBox'en, uanset om metankoncentrationen i indløbsluften var fx 700 ppm eller 940 ppm.

7.2.15 Udvikling af det mikrobielle samfund i BioBox'en i Hillerød

BioBox'en i fuldskala blev kørt i 83 dage. Ud over målinger af metanreduktion blev der løbende samlet prøver af den suspension, som blev dannet, hver gang skumlaget blev rensat med metalnet (pres-og-slip) placeret i BioBox'en (FIGUR 20). Hver gang metalnettet blev presset, blev der drænet vand og mikrober (biomassen) fra skumlagene. Den dræned suspension blev opsamlet, bundfældet med centrifugering i laboratorie og anvendt til bestemmelse af det mikrobielle samfund (DNASense) (FIGUR 23).

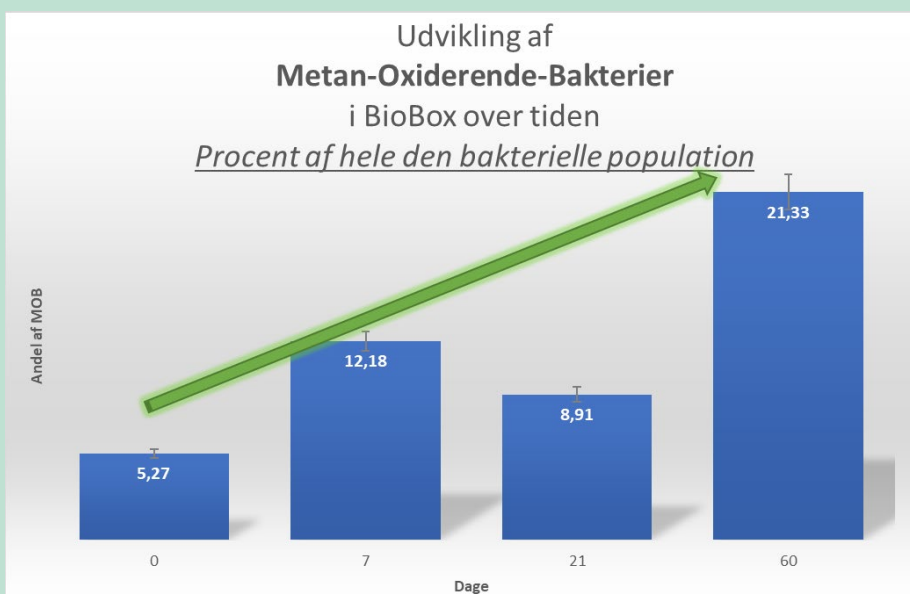
3.2 Table 2: The 25 most abundant genera in all samples excluding samples 03 and 07

The most abundant genera across all samples. If no genus level classification could be obtained, the lowest assigned taxonomic classification is given. In addition, the phylum level classification is given (Proteobacteria at class level).

	Biologisk luftrensningsfilter				Vandværk			
Firmicutes; Lactobacillus -	0	0	0	0	27.6	0	0	0
Gammaproteobacteria; Crenothrix -	0	0	0	0	5.2	11.2	2.5	18.1
Actinobacteria; Mycobacterium -	5.8	1.1	0.3	23.5	0	0.8	0.6	0.7
Euryarchaeota; Cuniculiplasma -	0	0	0	27.6	0	0	0	0
Gammaproteobacteria; Acinetobacter -	0	0	0	0.2	0	0	0.5	24.1
Gammaproteobacteria; Acidithiobacillus -	0	0	0	22.4	0	0.1	0	0
Nitrospirae; Nitrospira -	0	0.5	0	0	0.7	4.6	0.4	16.1
Firmicutes; f__Clostridiaceae_f__OTU_6 -	0	0	0	0	0	0	0	9.1
Acidobacteria; f__Blastocatellaceae_OTU_14 -	0	0	0.7	0	0	0.1	4.6	2.2
Thaumarchaeota; archaeon -	0	12.9	0	0	0	0	0	0
Firmicutes; Sulfobacillus -	0	0	0	12.2	0	0	0	0
Gammaproteobacteria; Chujibacter -	0.9	11.2	0	0	0	0	0	0
Gammaproteobacteria; Rhodanobacter -	5.7	1.1	1.6	0	0	2.9	0	0

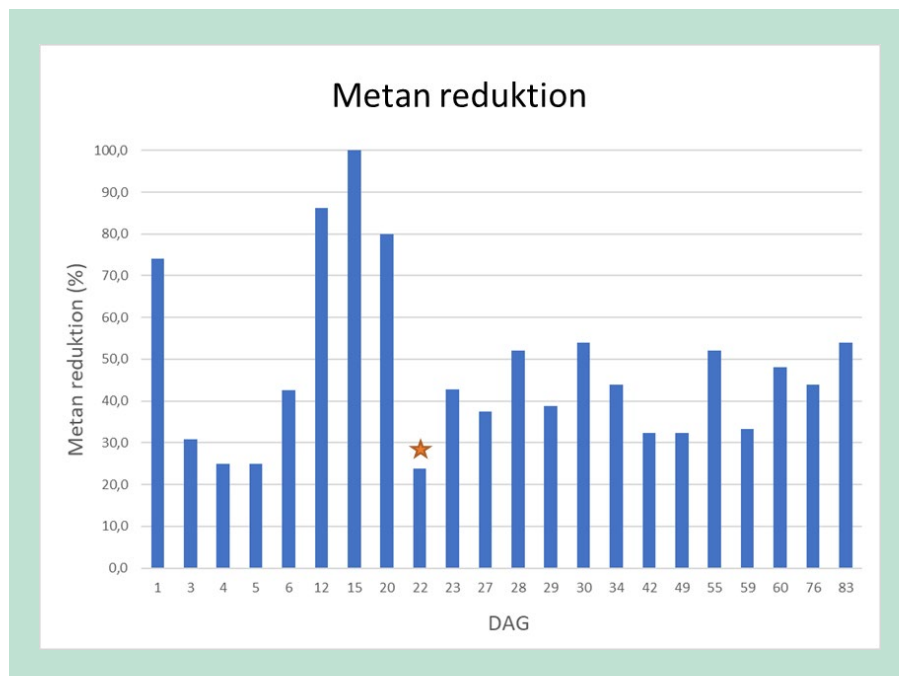
FIGUR 23. Udtræk af data fra NGS-analysen af den mikrobielle sammensætning på en af de i alt fire drænprøver opsamlet ved rensning af skumlagene i BioBox'en fra Hillerød.

Resultaterne af den fulde bestemmelse af mikrobielle samfund i BioBox'en viste, ikke overraskende, at fraktionen af mikrober, som kunne identificeres som metanreducerende bakterier (MOB) steg fra 5 % i opstarten til 12 % efter Dag 7 og helt til >21 % efter Dag 60 (FIGUR 24).



FIGUR 24. Opsummerede data, som viser andel (%) af de identificerede metanforbrugende mikrober (MOB'er) ift. det totale mikrobielle samfund. Drænprøver var opsamlet ved periodiske rensninger af skumlagene i BioBox'en på Hillerød Vandværk på Dag 0, 7, 21 og 60.

Den positive udvikling i MOB-sammensætningen af det totale mikrobielle samfund i skumlagene, hvor andelen af MOB'er voksede fra de initiale 5 % til >21 %, var en klar indikation af, at de introducerede MOB'er fra sandfiltre trivedes godt og var veletableret i skummet i BioBox'en. Disse observationer stemte godt overens med de sideløbende målinger af metanreduktionen i udblæsningsluften fra vandværker, som i gennemsnittet over 83 dage lå på >47,5 % (FIGUR 25).



FIGUR 25. Metanreduktion (andel, %) i den filtrerede luft fra vandværkets iltbassins, igennem BioBox'ens fuldskalafilter.

* En store-end-normal-rensning af skumlaget på Dag 22 pga. tilstopning.

7.2.16 Opsummering af fuldskalaforsøg i Hillerød

Det opstillede BioBox-filter til reduktion af metan fra udblæsningsluften på vandværket fungerede efter hensigten. Som det fremgår af FIGUR 24 og FIGUR 25, sker der i de første 21 dage en tilpasning af det mikrobielle samfund i skumlagene. Andelen af MOB'er næsten fordobles over 21 dage (ref. opstart 5 %, efter 21 dage ~9 %). Denne fordobling er nok til at øge metanreduktionen til 80-100 % på hhv. Dag 20 og Dag 15. I perioden Dag 3 til Dag 6 sker der imidlertid en tydelig ændring i BioBox'en, hvor reduktionen af metan falder til 20 %, mens mængden af MOB'er øges fra 5 % i opstarten til 12 % på Dag 7. Det ville være forventeligt, at en stigende andel af MOB'er følges af øget metanreduktion, men det afhænger i høj grad af etablering af MOB'er på matricen (biofilm), den optimale kontakt med metanholdig luft m.m.

Men mikroberne, især MOB'er havde det fint i matricen. Så fint, at dette bidrog til, at skumlagene efter 21 dage, udviste en meget stor modstand overfor den metanholdige luft, hvor voksende biofilm tilstoppede porerne i skummet (matricen), som igen krævede en solid rensning med metalnet (flere gentagne pres-og-slip-processer). Denne ekstra rensning løsenede meget af biofilmen (inkl. MOB'er) samt eventuelle andre urenheder i skumlagene, så luften igen let kunne filtreres. Dette medførte en tydelig fjernelse af et stort antal mikrober, inkl. MOB'er, fra matricen. En mere porøs skummatrice med færre MOB'er resulterede i en faldende metanreduktion, fra ca. 80 % Dag 20 til ca. 25 % på Dag 22 (FIGUR 25). Denne ekstra rensning viste sig at være meget positiv for BioBox'ens drift over de næste 60 dage. For det første genindtog

MOB'er meget hurtigt matricen, og deres andel kunne måles til at være op til 21 % af alle mikrober (Dag 60). For det andet blev metanreduktionen i skumlagene stabiliseret de næste 60 dage (Dag 23 til Dag 83), hvor den for det meste lå mellem 40 % og 50 %.

Den gennemsnitlige metanreduktion i BioBox'en lå på ca. 50 %. Metanindholdet i udblæsningsluften fra vandværket varierede fra 700 ppm op til 5.000 ppm, afhængigt af hvilke grundvandsboringer der blev brugt den pågældende dag eller periode. Kigger man mere nøje på metanreduktionen, hvor vandværksluften indeholdt over 3.000 ppm metan, var reduktionen på ca. 54 %. Fokuseres på metanreduktionen, hvor vandværksluften indeholdt under 3.000 ppm metan, var reduktionen på ca. 45 %. Disse udregninger viser, at BioBox'en muligvis foretrak de lidt højere metankoncentrationer (3.000-5.000 ppm) i forhold til metanreduktionseffekt, men også fungerende udmærket ved lavere (500-3.000 ppm) metankoncentrationer.

7.2.17 Semitekniske fuldskalaforsøg i Horsens

Efter ca. 3 måneders drift af BioBox'en i fuldskala i Hillerød blev hele opstillingen afmonteret og bragt til Højballegård Vandværk i Horsens. I første omgang blev BioBox'en dog flyttet til Kemis Vandrens for flere forbedrende småjusteringer. En af de små tilpasninger var et finere, specialdesignet metalnet i bunden, der blev lagt over det eksisterende, grovere metalnet. Det fine metalnet skulle bedre kunne understøtte de delvis tunge, våde skumlag. Der blev også udviklet et nyt system til dosering af vand med sporstoffer (NPK, Cu). Det nye system skulle dosere samme mængde af vand med sporstoffer til toppen af skummet som i Hillerød, omend denne gang med konstante mikrodåber, der sprøjtes over skumoverfladen i toppen (FIGUR 26).



FIGUR 26. Opsætning af forsøg med BioBox'en i fuldskala på Højballegård i Horsens. BioBox'en havde undergået små justeringer ift. Hillerød såsom ekstra metalnet i bunden og et doseringssystem til sporstoffer med konstante mikrodråber, der sprøjtes over skumoverfladen i toppen.

De første udregninger baseret på forekomsten af metan i rå grundvand tydede på, at den forventede koncentration af metan i udblæsningsluften på Horsens Vandværk skulle ligge i omegnen af 50-100 ppm. Det var netop derfor, Horsens Vandværk blev udvalgt til afprøvning af BioBox'en som et sted (vandværk) med mindre metan i luften end i Hillerød (hotspot).

Det viste sig hurtigt, at indblæsningsluften til BioBox'ens filter på Horsens Vandværk havde en lavere koncentration af metan end forventet (0-32 ppm). Dette skyldes opbygningen af et iltningssystem, hvor ilt tilføres grundvandet i rørene, og metan først frigives over forfiltrene (FIGUR 27).

Ved at bruge en håndholdt metanmåler (monteret på et langt stativ) kunne den højeste metankoncentration måles i luften lige over den runde iltningsskive i filtrene (op til 32 ppm), men metankoncentrationen i luften blev reduceret til ca. 10 ppm mindre end 1 meter væk fra iltningsskiven.

Luftslange, som skulle føre metanholdig luft fra forfiltrene til BioBox'en med en luftpumpe, var monteret på indersiden af glasvinduerne på forfiltrene (FIGUR 27), hvor målinger af metankoncentrationen lå på mellem 3 ppm og 12 ppm.



FIGUR 27. Forfiltrene på Højballegård Vandværk i Horsens. Grundvandet i rørene tilsættes ren ilt, hvorved metan afgasser over sandfiltrene i rummet.

7.2.18 Fjernelse af metangas i udblæsningsluften på vandværket

Det stod desværre hurtigt klart, at den lave koncentration af metan i luften kunne være en udfordring for en normal etablering og kørsel af BioBox'en i Horsens.

BioBox'en blev i opstarten inokuleret med mikrober fra egne sandfiltre som beskrevet om Hillerød Vandværk. BioBox'en i Horsens kørte fra 20. april til 10. juni 2021. Der blev lagt meget ekstra arbejde i forsøg på løbende at optimere metankoncentrationen i den luft, der skulle filtreres igennem BioBox'en, og på at holde på og hjælpe etablering af MOB'er i skummatricen. Men efter 50 dage med varierende succes blev det valgt at indstille forsøget i Horsens. DNA-analyser blev fravalgt, da det vurderedes, at de ikke ville være brugbare.

I de første uger med BioBox'en i Horsens, hvor koncentrationen af metan i luften lå mere stabilt på 14-16 ppm (hvilket desværre var langt under den forventede metankoncentration på 50-100 ppm), blev metankoncentrationen i den filtrerende luft igennem BioBox'en reduceret til ca. 10 ppm (30 %). Det var derfor håbet, at MOB'er var ved at etablere sig i matricen, og at man efter 2-4 uger, som i Hillerød, ville kunne se en yderligere reduktion på 50-60 %.

Desværre viste det sig, at metanreduktionen i perioden efter uge 4 ikke var målbar. Dette skyldtes sandsynligvis, at MOB-samfund i skumlagene ikke kunne etableres som forventet, men var udsultet som følge af det lave eller periodisk manglende metan i den filtrerende luft (ofte målt til 0 ppm). Selv de overlevende MOB'er var på grund af det lave metanindhold (som MOB'erne bruger som C-kilde) så udmattede, at de gik i dvaletilstand og derfor ikke havde tilstrækkeligt mange aktive MMO-enzymen til brug for de tidspunkter, hvor metanindholdet i luften skiftede fra fx 0 ppm til fx 16 ppm. Da man ikke kunne observere metanreduktion i BioBox'en efter uge 4 (Dag 28), blev det som nævnt valgt at indstille forsøget på Dag 50.

7.3 Opsummering og konklusion

Eksistensen af metanoxiderende bakterier (MOB) i sandfiltrene, som fjerner det resterende metan (5 %) i vandet efter grundvandsiltning på vandværkerne, var velkendt. Det store spørgsmål var, om man kunne anvende de samme naturlige mikrober til at reducere de 95 % metan, som frigives fra grundvandet ved iltning på vandværkerne og ender i atmosfæren.

I projektet BioBox forsøgte projektgruppen at udvikle en ny teknologi til reduktion af metan fra udblæsningsluften på vandværkerne. Det vigtigste ved teknologien var at få etableret de naturlige MOB'er fra sandfiltre på en udvalgt matrice og tilføre alle nødvendige næringsstoffer til MOB'ernes normale funktion med det formål at fjerne metan fra luften. Projektet viste, at det er muligt at anvende sandfiltermikrober (ref. MOB'er) til reduktion af metan fra udblæsningsluften på et vandværk.

- Laboratorieforsøgene viste, at den bedste matrice til etablering og aktivitet af MOB'er var skummateriale (børnemadras). Fx steg antallet af MOB'er i kolonner med skum, der modtog luft med 50 ppm metan hele 400 gange efter 64 dage i forhold til opstart. Til sammenligning faldt antallet af MOB'er i det andet undersøgte materiale, træflis, 10 gange i forhold til opstart. Mens kolonner med skummateriale fjernede 14 % af metanet, kunne kolonner med træflis reducere maks. 9 % af metanet.
- Pilotskalaforsøg viste, at skummateriale inokuleret med mikrober fra sandfiltre eller kompost kunne reducere metan i indblæsningsluften. Den største metanreduktion kunne dog observeres i kolonnen med skum beriget med sandfiltermikrober, hvor metanet blev reduceret fra 100 ppm til 35 ppm (65 %).
- Den semitekniske BioBox opstillet i fuldskala i Hillerød virkede efter hensigten. Andelen af MOB'er i skummatricen steg fra 5 % i opstarten til >21 % efter 60 dage. Den gennemsnitlige metanreduktion i BioBox'en lå på ca. 50 % og nåede til tider mellem 80-100 %. Den gennemsnitlige metanreduktion så ud til at være størst (54 %), når metankoncentrationen i luften lå på mellem 3.000-5.000 ppm, omend BioBox'en også virkede udmærket ved lavere metankoncentrationer i luften ml 500-3.000 ppm (45 %).
- Den semitekniske BioBox i fuldskala i Horsens virkede desværre ikke helt efter planen. Grundet de lavere metankoncentrationer end forventet i udblæsningsluften (forventet 50-100 ppm, målt 0-32 ppm) kunne MOB'er ikke etableres tilfredsstillende i BioBox'en. Over de første 4 uger blev der observeret ca. 30 % metanreduktion, men efter Dag 28 var reduktionen ikke målbar. Dette skyldtes udelukkende den generelt lave metankoncentration i luften, som til tider lå på 0 ppm, hvilket bevirkede, at MOB'er i matricen ikke kunne vækste og etableres.

Det lykkedes projektgruppen at udvikle og verificere den nye bæredygtige BioBox-teknologi, som anvender naturlige sandfiltermikrober (MOB'er) til reduktion af metan fra udblæsningsluften på et vandværk, der anvender grundvand til drikkevandsproduktion. Teknologien virkede lidt bedre ved højere metankoncentrationer (>3.000 ppm), men kunne uden videre etableres og fjerne >45 % metan selv ved metankoncentrationer >500 ppm. Teknologien havde dog sine begrænsninger (ikke anvendelig) de steder, hvor metankoncentrationer lå på mellem 1-32 ppm.

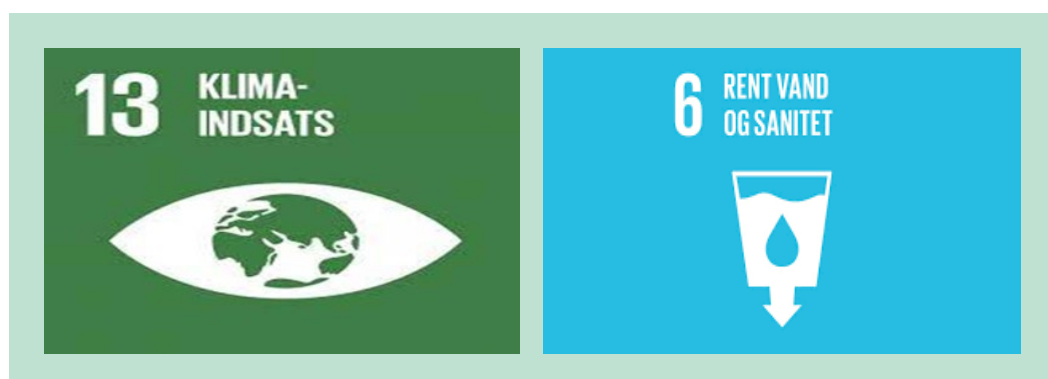
Perspektivering

BioBox forventes at være en kosteffektiv løsning (ca. 1 øre/m³ drikkevand) for vandværker. Prisen er beregnet på baggrund af en opstartsinvestering på ca. 75.000 DKK til opbygning af BioBox'en på vandværket, hvorefter der vil kunne forventes et mindre årligt gebyr til service-ring på 15.000 DKK. For vandværket Stenholtværket i Hillerød (projektpartner) med en årlig produktion på 310.000 m³ drikkevand vil meromkostningen det første og de kommende år være hhv. 30 øre/m³ og 5 øre/m³ drikkevand. Mange danske vandværker (fx Højballegård Vandværk i Horsens) producerer >1 mio. m³ drikkevand/år, og her vil BioBox-løsningen koste ca. 1 øre/m³. Der skal nævnes, at projektpartneren Hillerød Vand har planer om at bygge et stort vandværk anno 2025, der skal producere op til 17 mio. m³/år (<https://beretning.hillerodforsyning.dk/vandomraadet>), hvor en merpris for BioBox-løsningen vil ligge langt under 1 øre/m³

7.4 Projektpartnere



FIGUR 28. Projektpartnere.



FIGUR 29. Verdensmål.

8. 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.
- Den Europæiske Unions Tidende. (2020). *Europa-parlamentets og rådets direktiv (EU) 2020/2184*. Den Europæiske Unions Tidende.
- Erwin, D. P., Erickson, I. K., Delwiche, M. E., Colwell, F. D., Strap, J. L., & Crawford, R. L. (April 2005). Diversity of Oxygenase Genes from Methane- and Ammonia-Oxidizing Bacteria in the Eastern Snake River Plain Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, s. 2016-2025.
- 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*.
- Kiefer, K., Bader, T., Salhi, E., Janssen, E. M., Gunten, U. v., & Hollender, J. (September 2020). Chlorothalonil transformation products in drinking water resources: Widespread and challenging to abate. *Water Research*.
- 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.
- Lenschow, S. R. (2008). Generel information om chloridaon og nedbrydningsprodukter. Niras.
- 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.
- Miljøstyrelsen. (2018). Behandlingshyppighed og pesticidbelastning baseret på salg og forbrug. Miljøstyrelsen.
- Papadopoulou, A., Hedegaard, M. J., Deschesne, A., Albrechtsen, H.-J., Musovic, S., & Smets, B. F. (Oktober 2018). Methanotrophic contribution to biodegradation of phenoxy acids in cultures enriched from a groundwater-fed rapid sand filter. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Pinilla-Redondo, R., Olesen, A. K., Russel, J., Vries, L. E., Christensen, L. D., Musovic, S., . . . Sørensen, S. J. (Oktober 2021). Broad Dissemination of Plasmids across Groundwater-Fed Rapid Sand Filter Microbiomes. *American Society for Microbiology*.
- 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.
- Tang, K., Ooi, G. T., Litty, K., Sundmark, K., Kaarsholm, K. M., Sund, C., Andersen, H. R. (2017). Removal of pharmaceuticals in conventionally treated wastewater by a polishing Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) with intermittent feeding. *Bioresource Technology*, s. 77-86.
- Thorling, L. A. (2021). Grundvand. Status og udvikling 1989-2019. GEUS.
- Thorling, L. A. (2021). Grundvand. 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*.

Wu, H., Wu, R., Sun, X., Li, J., Han, W., & Wang, L. (Juli 2016). Biodegradation mechanism of 1H-1,2,4-triazole by a newly isolated strain *Shinella* sp. NJUST26. *Nature*.

Xu, Y., Chen, X., Yuan, Z., & Ni, B.-J. (2018). Modeling of Pharmaceutical Biotransformation by Enriched Nitrifying Culture under Different Metabolic Conditions. *Environmental Science and Technology*.

BioBox Bioteknologi til klimaneutral drikkevandsproduktion

I Danmark og i mange andre lande verden over produceres drikkevand fra grundvand, hvor de naturligt forekommende forureningsstoffer (såsom NH_4) fjernes i sandfiltre på vandværkerne. Det anaerobe grundvand indeholder store mængder metan, som under ilttingsprocessen på vandværket frigives til atmosfæren, mens det resterende metan i vandet omsættes af de naturlige metanoxiderende bakterier i drikkevandssandfiltrene.

Formålet med projektet er at bruge den nyeste videnskabelige forståelse af naturlige, metanoxiderende bakterier, som lever i drikkevandssandfiltre på vandværker, til at udvikle en miljøvenlig bioteknologi (BioBox) til omsætning af metangas fra udblæsningsluften fra et vandværks ilttingsrum.

I projektet udvikles og verificeres den nye bæredygtige bioteknologi, BioBox, som anvender naturlige mikrober fra sandfiltre til reduktion af metan fra udblæsningsluften på et vandværk, som producerer drikkevand ved anvendelse af grundvand.



Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk