

BTO 2016.203(s) | Mei 2016

BTO rapport

Pyrazool - inventarisatie
full-scale data en
verkennend
experimenteel
onderzoek

BTO

De verwijdering van pyrazool: verkennend experimenteel onderzoek

BTO 2016.203(s) | Mei 2016

Opdrachtnummer

400554

Projectmanager

Bas Wols

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Drinkwatertechnologie van de toekomst

Kwaliteitsborger(s)

Paul van der Wielen, Emile Cornelissen

Auteur(s)

Wim Hijnen (H2), Roberta Hofman-Caris (H2), Cheryl Bertelkamp (bewerking, H1, H3, H4, H5)

Verzonden aan

Vitens, Evides, WML, Oasen, PWN, Waternet, Dunea, Brabant Water, Waterbedrijf Groningen, WMD Water

Jaar van publicatie
2016

Meer informatie

Cheryl Bertelkamp
T 06 - 27249911
E cheryl.bertelkamp@kwrwater.nl

Keywords pyrazool, sorptie,
biodegradatie,
drinkwaterzuivering

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



Watercycle
Research
Institute

BTO 2016.203(s) | Mei 2016 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Samenvatting

Dit rapport heeft op basis van een literatuurstudie, data van de drinkwaterbedrijven en een kleinschalig experiment gekeken naar de verwijdering van pyrazool door verschillende zuiveringsprocessen. In de literatuur zijn weinig studies gepubliceerd over de omzetting van pyrazool, maar wel zijn enkele onderzoeken verricht naar isomeren en derivaten van pyrazool. Biodegradatie van deze isomeren en derivaten lijkt mogelijk (afhankelijk van de omstandigheden), maar blijft meestal beperkt tot de afbraak van functionele groepen aan de ringstructuur (de ringstructuur zelf blijft intact). De bacteriesoort *Pseudomonas acidovorans* lijkt de ringstructuur wel te kunnen afbreken. Data verkregen van de drinkwaterbedrijven gaf meer inzicht in welke processen wel of niet effectief waren voor de omzetting van pyrazool. Terwijl coagulatie en chloordosering weinig effect hadden op de verwijdering van pyrazool (verwijdering < 25%), bleken oxidatieprocessen (O_3 = <25 - 75%, O_3/H_2O_2 (UV) = 75 - 100%), fotolyse (UV (midden druk lampen) = <25 - 100%) en biologische processen (actieve kool = <25 - 75%, snelzandfilter/langzaamzandfilter/oeverfiltratie = 75 - 100%) het meest effectief voor de verwijdering van pyrazool. De verwijdering met behulp van fotolyse/oxidatie is sterk afhankelijk van de gebruikte dosis UV/oxidator, maar ook de verwijdering van pyrazool met biologische processen varieert sterk (mogelijk veroorzaakt door verschillen in redoxconditie, aandeel sorptie/biodegradatie en/of de aanwezige microbiële populatie). Om de mogelijke oorzaken van deze verschillende omzettingen in de biologische processen te achterhalen, is het effect van sorptie/biodegradatie en redox onderzocht in een kleinschalig experiment. Uit de resultaten van dit experiment kan worden geconcludeerd dat pyrazool wordt verwijderd door zowel sorptie als biodegradatie, in ieder geval voor oeverfiltratiezand, actief-slib en actieve kool. De verwijdering van pyrazool door biodegradatie is vergelijkbaar of iets hoger (26-65%) dan door sorptie (20-46%). Biodegradatie van pyrazool verloopt beter onder aerobe condities dan onder anaerobe condities. Aanvullend onderzoek naar de volgende aspecten wordt voorgesteld: (1) Het inventariseren van de parameters (bijv. temperatuur, DOC concentratie, pH, etc.) die effect kunnen hebben op de microbiële populatie en daarmee pyrazool omzetting, (2) het effect van proces parameters, waterkwaliteit en enten op afbraak van pyrazool onderzoeken in kolomexperimenten op locatie en (3) het vaststellen van de bacterie(soort) die verantwoordelijk is voor pyrazool degradatie onder gecontroleerde condities in een ophopingsexperiment. Met behulp van de informatie uit dergelijke onderzoeken wordt het voor drinkwaterbedrijven wellicht mogelijk hun biologisch zuiveringsprocessen te sturen/optimaliseren voor de verwijdering van pyrazool (en meer in het algemeen voor organische microverontreinigingen).

Inhoud

1	Inleiding	4
1.1	Aanleiding	4
1.2	Doel van dit onderzoek	4
2	Literatuurstudie	5
2.1	Biologische afbraak van chemicaliën	5
2.2	Biodegradatie pyrazool	5
2.3	Omzetting van op pyrazool gebaseerde industriële producten	6
2.4	Omzetting van op pyrazool gebaseerde medicijnen	6
2.5	Omzetting van op pyrazool gebaseerde bestrijdingsmiddelen	7
2.6	Biodegradatie van enkele andere pyrazoolderivaten	11
2.7	1,1-dimethylhydrazine	12
2.8	Conclusies literatuuronderzoek	13
3	Full-scale data	14
3.1	Waternet	14
3.2	Dunea	14
3.3	Evides	14
3.4	Oasen	15
3.5	PWN	15
3.6	WML	16
3.7	Conclusie full-scale data pyrazool	16
4	Verkennend experimenteel onderzoek	17
4.1	Onderzoeksvragen	17
4.2	Opzet experiment	17
4.3	Resultaten experiment	19
5	Conclusies en aanbevelingen	25
5.1	Conclusies	25
5.2	Aanbevelingen	25
6	Literatuur	28
	Bijlage I Samenstelling mineraal medium	31

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

In Juli 2015 werd pyrazool gedetecteerd in de Maas. De oorzaak bleek een niet goed werkende afvalwaterzuivering van Sittetech. Normaal gesproken wordt pyrazool voor meer dan 99% omgezet in de biologische zuivering van deze afvalwaterzuiveringsinstallatie. Door een tijdelijke stop in de toevoer van pyrazool naar deze biologische zuivering, lijkt de microbiële populatie aanwezig in dit proces deels geïnactiveerd te zijn. Doordat de fabriek die pyrazool produceerde weer opgestart werd, ontstond er weer een pyrazool afvalstroom. Door deze plotselinge aanwezigheid van pyrazool (na de tijdelijke stop) werd pyrazool onvoldoende verwijderd in dit biologische proces wat resulteerde in verhoogde pyrazool concentraties in het water dat geloosd wordt op de Maas. De gedachte is dat de microbiële populatie (die in staat is pyrazool af te breken) aanwezig in de biologische zuivering, door de stop in toevoer van pyrazool, deels geïnactiveerd is. Dit is echter nog niet bewezen.

Aangezien er zo goed als geen studies bekend zijn naar het verwijderingsgedrag van pyrazool in de drinkwaterzuivering waren Evides, Dunea en WML genoodzaakt uit te gaan van een worst-case scenario (namelijk geen verwijdering in de zuivering) en dus de inname van oppervlaktewater (tijdelijk) te stoppen. De concentraties pyrazool in de rivier de Maas lagen rond de 2,2 µg/L (max. = 7,6 µg/L, Keizersveer, Evides), 1,7 µg/L (max. = 6,5 µg/L, Afgedamde Maas, Dunea) en 1,7 µg/L (max. = 24 µg/L, Roosteren, WML). De signaleringswaarde voor pyrazool (1 µg/L) is gelijk aan die van “overige antropogene stoffen” zoals vastgesteld in het waterleidingbesluit. In Augustus 2015 heeft minister Schultz van Haegen van Infrastructuur en Milieu een tijdelijke norm vastgesteld van 15 µg/l (voor maximaal twee jaar) voor de concentratie van pyrazool in ruw water en drinkwater.

Uit data van Rijkswaterstaat en PWN blijkt dat pyrazool ook aanwezig is op verschillende punten in De Rijn en in het IJsselmeer in 2 tot 14 µg/L, waaruit afgeleid kan worden dat het niet om incidentele lozingen gaat (persoonlijke communicatie Martijn Pijnappels, Rijkswaterstaat). De gevonden pyrazool concentraties in de De Rijn zijn terug te leiden naar INEOS Chempark Dormagen en een onbekende lozer bovenstrooms van Keulen. INEOS Chempark Dormagen in Duitsland loost pyrazool op De Rijn, gemeten pyrazool concentraties ter hoogte van INEOS in De Rijn lagen bij het begin van dit incident rond de 20 µg/L. Bij de grens met Nederland waren deze concentraties afgenomen tot een waarde van 12 – 13 µg/L (persoonlijke communicatie Gerard Stroomberg, RIWA).

Hierop volgend hebben verschillende drinkwaterbedrijven pyrazool metingen verricht in hun zuiveringen en zijn er ook diverse experimenten gedaan bij KWR om te achterhalen welke drinkwaterzuiveringsprocessen in staat zijn pyrazool te verwijderen (Hofman-Caris *et al.*, 2015). Uit deze resultaten bleek dat pyrazool in diverse zuiveringsprocessen in verschillende mate wordt verwijderd.

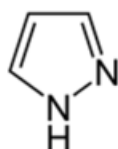
De drinkwaterbedrijven willen weten waardoor dit verschil in pyrazoolverwijdering tussen de diverse processen veroorzaakt wordt. In dit kader is deze studie ontworpen om te analyseren welke verwijderingsmechanismes (sorptie en/of biodegradatie) verantwoordelijk is/zijn voor de verwijdering van pyrazool.

1.2 Doel van dit onderzoek

Het doel van dit onderzoek is het vaststellen van het verwijderingsmechanisme van pyrazool (sorptie en/of biodegradatie) en de factoren die hierop van invloed zijn (zoals redoxconditie).

2 Literatuurstudie

Pyrazool (Wikipedia, 2015) is een heterocyclische aromatische verbinding en bestaat uit een vijftringstructuur met drie koolstofatomen en twee stikstofatomen. Het is een isomeer van imidazool en heeft vergelijkbare chemische eigenschappen als deze stof (Eicher *et al.*, 2012). Het is een zwakke organische base en is bestand tegen zuren, oxiderende en reducerende verbindingen (Eicher *et al.*, 2012). Derivaten van pyrazool worden gebruikt in geneesmiddelen, kleurstoffen, pesticiden, fungiciden, en bij complexatie- of extractieprocessen.



FIGUUR 1 STRUCTUUR VAN PYRAZOL (OFWEL 1,2-DIAZOL, $C_3H_4N_2$)

In de literatuur is nauwelijks informatie te vinden over de directe biologische omzetting van pyrazool in het milieu. Wel is er informatie beschikbaar over de biodegradatie van derivaten van pyrazool, of van derivaten waarbij pyrazool wordt gevormd (in totaal ca. 70 referenties in Scopus). Het gaat hierbij dan over (i) op pyrazool gebaseerde bestrijdingsmiddelen zoals fipronil, (ii) op pyrazool gebaseerde industriële producten (het isomeer imidazool) (iii) omzettingen van op pyrazool gebaseerde medicijnen, of (iiii) omzettingen van andere pyrazool derivaten zoals 1,1-dimethylhydrazine, een stof die als stuwvloeistof in raketbrandstof wordt gebruikt. In dit korte literatuuroverzicht wordt de nadruk gelegd op de biodegradatie van natuurlijke en kunstmatige derivaten van pyrazool. Hierbij wordt specifiek gekeken naar de afbraak van de vijftring pyrazool.

2.1 Biologische afbraak van chemicaliën

De omzetting van organische stoffen door micro-organismen is gericht op energievoorziening (dissimilatie) en celvorming (assimilatie). Dit gebeurt onder aerobe (met zuurstof als elektronenacceptor) of anaerobe (met andere elektronenacceptoren, zoals nitraat en sulfaat) omstandigheden. De meeste kleine organische verbindingen worden omgezet in de cel na transport door de celwand. Grotere verbindingen worden buiten de cel enzymatisch afgebroken vóórdat ze de cel in worden getransporteerd.

Binnen het microbiologische afbraakmechanisme van (an)organische verbindingen bestaat ook het zogenaamde co-metabolisme. Dit wordt gedefinieerd als de gelijktijdige omzetting van twee stoffen waar de afbraak van de tweede stof (het secundaire substraat) afhangt van de aanwezigheid van het primaire substraat. Het is bekend dat tijdens de afbraak van eenvoudige stoffen als methaan, propaan of eenvoudige koolhydraten sommige bacteriën, zoals *Pseudomonas stutzeri* OX1, schadelijke chloorhoudende oplosmiddelen, zoals tetrachloorethyleen en trichloorethyleen, in co-metabolisme afbraken (Ryoo *et al.*, 2000). Het enzym dat hierbij betrokken is, is methaanmono-oxygenase. Een ander voorbeeld van co-metabolisme in bacteriën is de omzetting van een cyclische verbinding als cyclohexaan in cyclohexanol door *Mycobacterium vaccae* (Beam *et al.*, 1974). Het principe van co-metabolisme werd ook gesuggereerd bij de afbraak van bromaat (van Ginkel *et al.*, 2005).

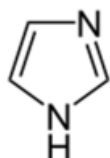
2.2 Biodegradatie pyrazool

Dat pyrazool biologisch kan worden veranderd blijkt uit een biologische studie met ratten (Feerman *et al.*, 1987). Zij demonstreerden dat pyrazool wordt omgezet naar hydroxy-pyrazool door microsomen geïsoleerd uit de lever van ratten. De ringstructuur werd niet afgebroken tijdens de omzetting in een zoogdier.

2.3 Omzetting van op pyrazool gebaseerde industriële producten

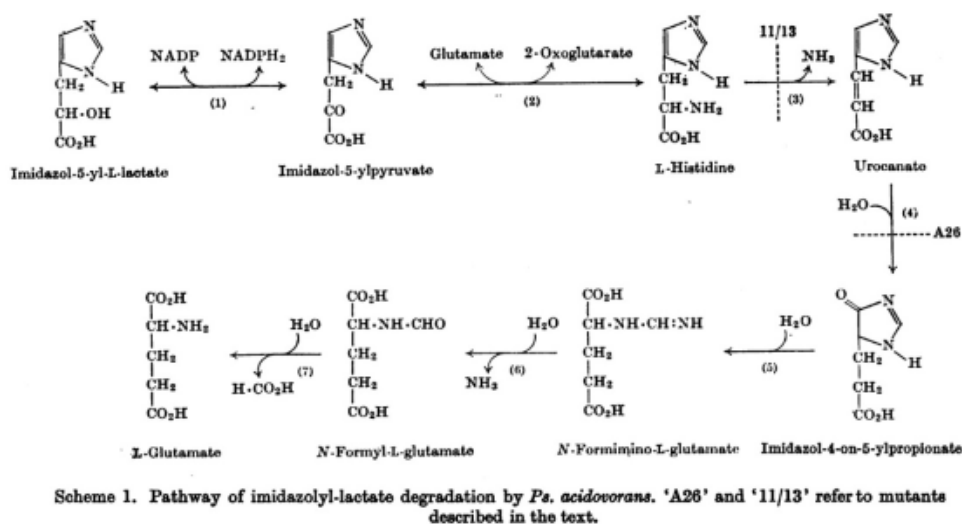
2.3.1 Het isomeer imidazool

De imidazoolring (Figuur 2) komt voor in veel natuurlijke producten en is aanwezig in belangrijke biologische bouwstenen, zoals histidine, en het daarvan afgeleide hormoon histamine. Daarnaast wordt imidazool onder andere gebruikt om corrosie te bestrijden op bijvoorbeeld koper en als vlamvertrager (Gašparac *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2015).



FIGUUR 2 STRUCTUUR VAN IMIDAZOOL

Een voorbeeld van de afbraakroute van het natuurlijke derivaat van imidazool L-histidine (imidazole-5-yl-L-Lactate) door *Pseudomonas acidovorans* wordt in de literatuur beschreven door (Coote *et al.*, 1969) (Figuur 3).



FIGUUR 3 BIODEGRADATIE VAN EEN IMIDAZOOLDERIVAAT

Uit het reactiemechanisme in Figuur 3 wordt duidelijk dat de ringstructuur van imidazool wordt afgebroken tot glutamaat, dat verder kan worden gebruikt (i) voor energiegeneratie door omzetting naar CO_2 en H_2O of (ii) als bouwsteen voor de aanmaak van eiwitten.

2.4 Omzetting van op pyrazool gebaseerde medicijnen

2.4.1 Fenazon

Antipyrine of fenazon (Figuur 4) is een derivaat van pyrazool. Pieper *et al.* (2010) bestudeerden de biodegradatie van dit geneesmiddel. Zij beschrijven de afbraakroutes en de gevormde microbiologische metabolieten (Figuur 5). Hieruit wordt duidelijk dat de pyrazoolring niet wordt afgebroken door de aanwezige micro-organismen.

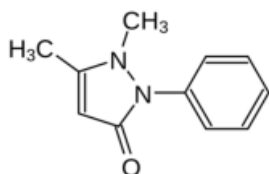


FIGURE 4 STRUCTUUR VAN ANTIPYRINE

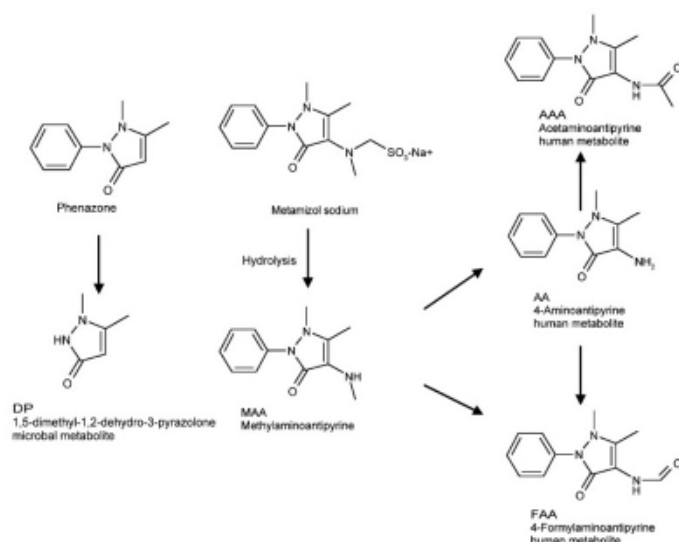


Fig. 2 – Structures and metabolism of phenazone (Saubert et al., 1977) and metamizole (Levy et al., 1995). All substances were analysed, except metamizole.

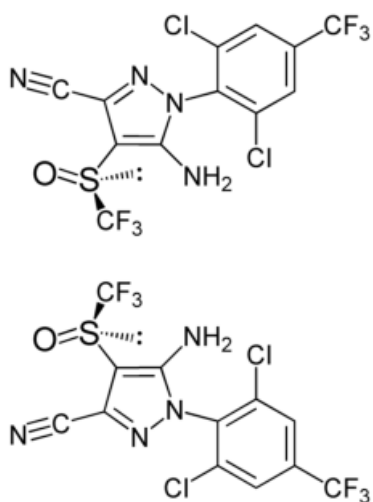
FIGUUR 5 AFBRAAKMECHANISME VAN FENAZON EN ZIJN MICROBIOLOGISCHE METABOLIETEN (PIEPER ET AL., 2010)

Pieper *et al.* (2010) concludeerden dat de enzymen nodig voor de afbraak van de fenylringen, dioxygenase en catechol dioxygenase niet aanwezig waren in het systeem en een niet nader gespecificeerde lange periode van aanpassing vereisen (Blecher *et al.*, 1981; Müller *et al.*, 1982). Biodegradatie van het pyrazoolderivaat aminopyrine door *Phenyllobacterium immobilis* wordt beschreven door Blecher *et al.* (1981), maar het metaboliet bevatte ook nog steeds de specifieke pyrazoolring. *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 produceert het enzyme aminopyrine N-demethylase tijdens de biodegradatie van kerosene (Saratale *et al.*, 2007).

2.5 Omzetting van op pyrazool gebaseerde bestrijdingsmiddelen

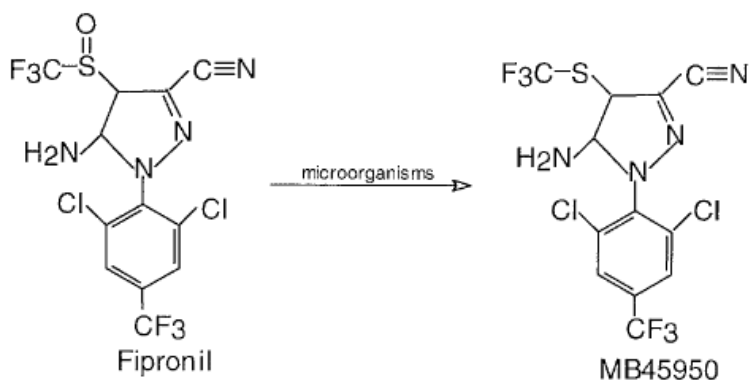
2.5.1 Fipronil

Fipronil is een insecticide en acaricide uit de groep fenylpyrazolen. Het wordt sinds 1993 op de markt gebracht. In Frankrijk is het gebruik ervan sinds 2004 verboden, omdat de stof in verband wordt gebracht met verhoogde bijensterfte. Ook de Europese commissie heeft de regels met betrekking tot het gebruik strenger gemaakt. Verder is de stof in Europa in principe tot 2017 toegelaten. De structuurformule is weergegeven in Figuur 6.



FIGUUR 6 STRUCTUURFORMULE VAN BEIDE ENANTIOMEREN VAN FIPRONIL

Volgens Shuai *et al.* (2012) kan Fipronil in water en in de bodem worden omgezet via zowel biologische als niet-biologische processen. Reductie van de stof leidt tot de vorming van fipronilsulfide, hydrolyse tot de vorming van fipronil-amide, fotolyse tot desulfinyl-fipronil, en oxidatie tot fipronil-sulfon. De samenstelling van de bodem, het water, de temperatuur en het zuurstofgehalte spelen een belangrijke rol in deze omzettingprocessen. Deze conclusies zijn in overeenstemming met de bevindingen van Lin *et al.* (2008), die ook aangeven dat biodegradatie afhankelijk is van het type sediment en de zuurstofconcentratie. In afwezigheid van micro-organismen konden zij geen afbraak aantonen, wat erop wijst dat biodegradatie inderdaad een belangrijke rol speelt in de omzetting. Mandal *et al.* (2013) concludeerden ook dat het belangrijkste metaboliet van fipronil sulfide is, maar dat ook sulfon en amide voorkomen. Deze auteurs hebben een aantal bacteriestammen geïsoleerd die voor deze omzettingen verantwoordelijk zijn. Overigens bleken de afbraakproducten zelf nog altijd de pyrazoolring te bevatten, wat erop kan wijzen dat deze verbinding zelf moeilijker te degraderen is. Dezelfde conclusie kan worden getrokken uit het werk van Zhu *et al.* (2004), zoals weergegeven in Figuur 7.

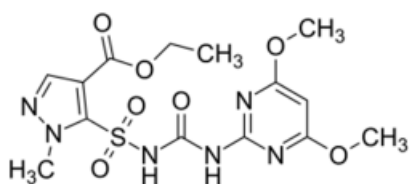


FIGUUR 7 MICROBIOLOGISCHE OMZETTING VAN FIPRONIL (ZHU ET AL., 2004)

Doran *et al.* (2009) stelden vast dat bij de reductieve omzetting van fipronil in de bodem ook adsorptie een belangrijke rol kan spelen. Fipronil werd ofwel direct gereduceerd tot fipronilsulfide, ofwel eerst geadsorbeerd en daarna gereduceerd. Het fipronilsulfide werd vervolgens weer in de bodem geadsorbeerd, maar bleek daar verder te accumuleren, wat erop wijst dat verdere biodegradatie van fipronilsulfide niet of nauwelijks optrad.

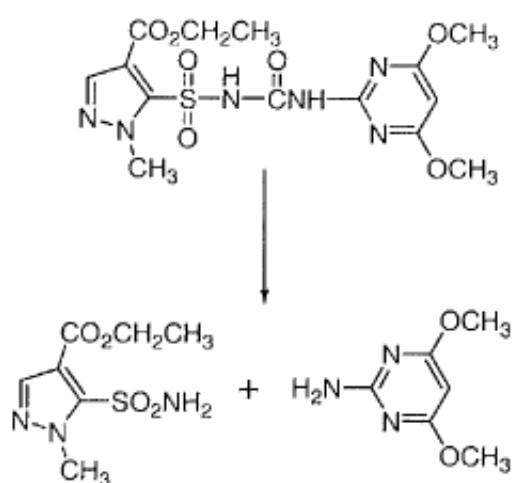
2.5.2 Pyrazosulfuron-ethyl

Pyrazosulfuron-ethyl wordt sinds 1990 gebruikt als herbicide. De structuurformule is weergegeven in Figuur 8.



FIGUUR 8 STRUCTUURFORMULE VAN PYRAZOSULFURON-ETHYL

Wang *et al.* (2012) stelden vast dat pyrazosulfuron-ethyl kan worden afgebroken door *Acinetobacter* sp. CW17. Deze omzetting is weergegeven in Figuur 9.



FIGUUR 9 BIODEGRADATIE VAN PYRAZOSULFURON-ETHYL DOOR CW17 (WANG *ET AL.*, 2012)

Xu *et al.* (2009) identificeerden drie bacteriestammen, D61, D66 en D713, die pyrazosulfuron-ethyl kunnen omzetten. D61 en D66 behoren tot *Pseudomonas* sp.. Bij een concentratie van 10,0 mg pyrazosulfuron-ethyl/L bleek D61 in staat de verbinding binnen twee dagen volledig af te breken, terwijl D66 hier vijf dagen voor nodig had. Bij een concentratie van 90 mg/L bleken beide daar twaalf dagen voor nodig te hebben. D713, een *Bacillus* sp. bleek in die twaalf dagen > 85,9% omzetting te bewerkstelligen.

Chemische omzetting kan op twee verschillende manieren plaatsvinden:

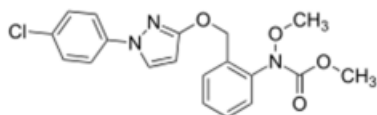
- Via hydrolyse van de sulfonyl-urea binding, die bij elke pH kan plaatsvinden
- Via de verzeping van de ester, die onder alkalische omstandigheden plaatsvindt.

De sulfonyl-urea binding kan worden gehydrolyseerd, waarbij CO₂ wordt gevormd met daarnaast arylsulfonamide en amino-heterocyclische verbindingen. Voorbeelden van dergelijke metabolieten zijn ethyl-1-methyl-5-sulfamoyl-1H-pyrazool-4-carboxylaat en 4,6-dimethoxypyrimidine-2-amine. De ontleding van de esterbinding kan plaatsvinden door de werking van extracellulair carboxyesterase. Vergelijkbare conclusies werden getrokken door Singh *et al.* (2013).

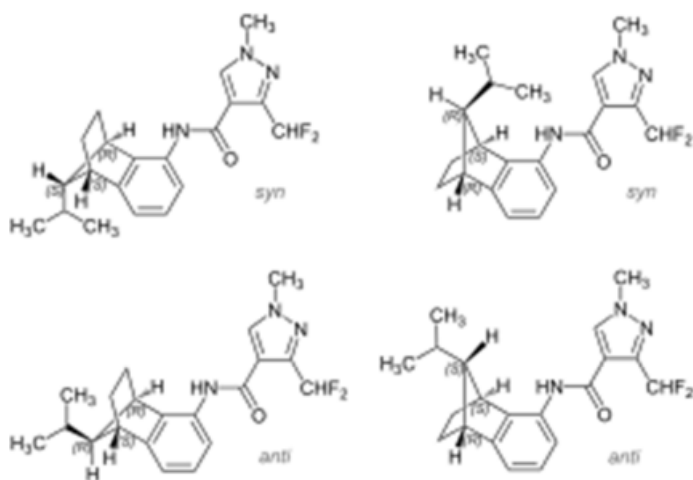
Bij alle hier beschreven omzettingsmechanismen bleek weer dat de pyrazoolring zelf intact blijft tijdens het degradatieproces.

2.5.3 Pyraclostrobin en isopyrazam

Pyraclostrobin en isopyrazam worden toegepast als fungiciden. Pyraclostrobin wordt toegepast sinds 2004, en isopyrazam sinds 2013. Isopyrazam bestaat uit een mengsel van twee *syn*- en twee *anti*-isomeren, die beide als racemisch mengsel aanwezig zijn. De verhouding van de *syn*- tot de *anti*-isomeren ligt tussen 78 en 100%. De structuurformules van beide fungiciden zijn weergegeven in Figuur 10 en 11.



FIGUUR 10 STRUCTUURFORMULE VAN PYRACLOSTROBIN

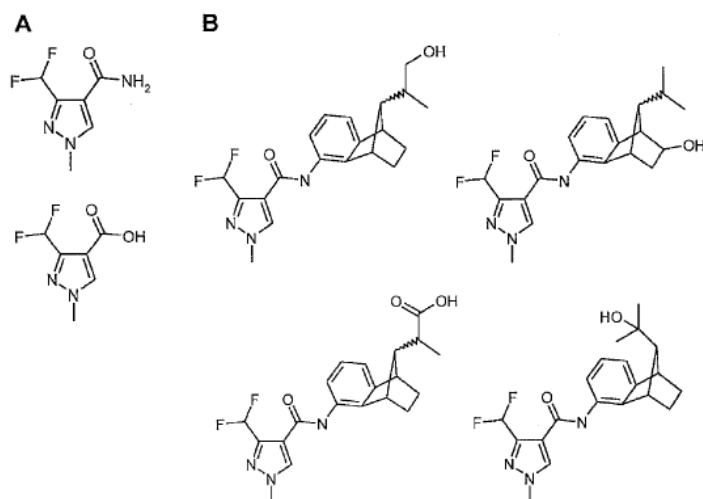


FIGUUR 11 STRUCTUURFORMULES VAN DE VIER ISOMEREN VAN ISOPYRAZAM

Reddy *et al.* (2013) stelden vast dat de biodegradatie van pyraclostrobin sneller verloopt in aanwezigheid van vocht dan onder droge omstandigheden, en dat de aanwezigheid van zuurstof de omzetting vertraagt.

Hand *et al.* (2010) bestudeerden de omzetting van isopyrazam. Fotolyse bij een golflengte >290 nm gaf wel enige omzetting te zien, maar hierbij blijft de pyrazoolstructuur zelf intact.

In afwezigheid van licht bleek de afbraak van isopyrazam erg traag te verlopen. Er trad wel enige omzetting op, maar zeker geen mineralisatie. De omzettingsproducten die konden worden aangetoond zijn weergegeven in Figuur 12.

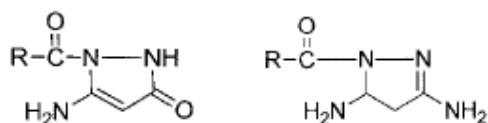


FIGUUR 12 OMZETTINGSPRODUCTEN VAN ISOPYRAZAM. A: OMZETTINGSPRODUCTEN VAN FOTODEGRADATIE. B: OMZETTINGSPRODUCTEN VAN BIODEGRADATIE (HAND ET AL., 2010)

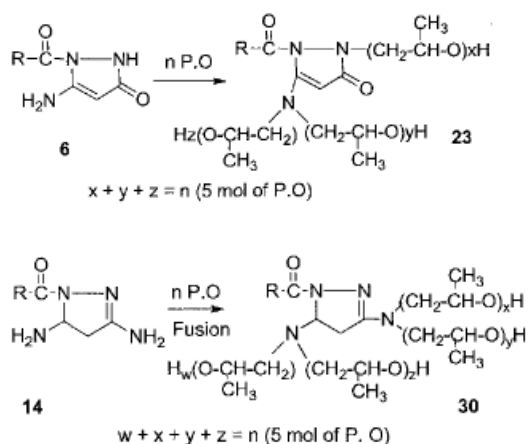
Ook hier blijkt weer dat de ringstructuur van pyrazool intact blijft tijdens de omzetting.

2.6 Biodegradatie van enkele andere pyrazoolderivaten

El-Sayed *et al.* (2015) hebben onderzoek gedaan naar derivaten van onder andere pyrazool die als surfactant kunnen worden toegepast. De uitgangsstoffen zijn weergegeven in Figuur 13. De hieruit gevormde surfactants zijn weergegeven in Figuur 14.



FIGUUR 13 OP PYRAZOOOL GEBASEERDE HETEROCYCLISCHE VERBINDINGEN DIE ALS UITGANGSTOF VOOR SURFACTANTS ZIJN GEBRUIKT (EL-SAYED ET AL., 2015)



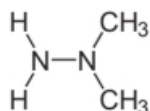
FIGUUR 14 OMZETTING VAN PYRAZOOOLDERIVATEN IN SURFACTANTS (EL-SAYED ET AL., 2015)

Volgens de auteurs werden alle surfactants volgens de "River Die-Away test" binnen één dag voor 40-50% omgezet, en binnen een week voor meer dan 90%. Deze test is echter gebaseerd op oppervlaktespanningsverschillen, en zegt dus in feite nog niets over de omzetting van de pyrazoolring zelf.

4,5-diamino-1-pyrazool is een kleurstof. Het 2-hydroxy-ethyl derivaat hiervan wordt in cosmetica toegepast. Volgens (Xiu-Yan *et al.*, 2013), kan 4,5-diamino-1-pyrazool door micro-organismen worden omgezet, maar de auteurs geven geen informatie over omzettingsmechanismen en/of -producten.

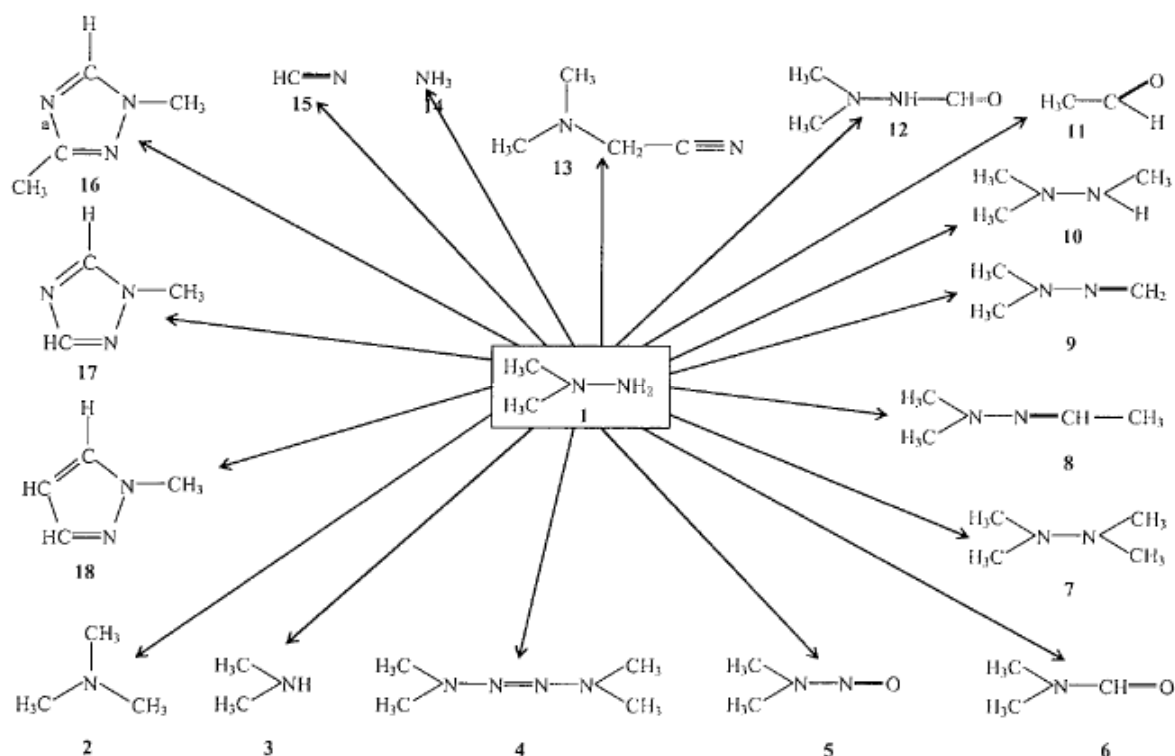
2.7 1,1-dimethylhydrazine

1,1-dimethylhydrazine (1,1-DMH) wordt gebruikt als stuwvloeistof in raketbrandstof. Op plaatsen waar lanceringen plaatsvinden of hebben plaatsgevonden worden deze stof en zijn metabolieten aangetroffen in de ondergrond en het grondwater. De structuurformule van 1,1-dimethylhydrazine is weergegeven in Figuur 15.



FIGUUR 15 STRUCTUURFORMULE VAN 1,1-DIMETHYLHYDRAZINE

De omzettingsproducten, die worden aangetroffen zijn weergegeven in Figuur 16. Verbinding 18 is een pyrazoolderivaat.



FIGUUR 16 OMZETTINGSPRODUCTEN VAN 1,1-DIMETHYLHYDRAZINE (CARLSEN *ET AL.*, 2008)

Carlsen *et al.* (2008) stelden vast dat alle 18 omzettingsproducten goed biodegradeerbaar zijn, met een halfwaardetijd van enkele weken, maar dat hierbij wel de aanwezigheid van zuurstof vereist is. Ook volgens Kenessov *et al.* (2012) zijn deze verbindingen min of meer biodegradeerbaar, maar het feit dat verbinding 18 wel overal kan worden aangetroffen waar 1,1-DMH in de bodem terecht is gekomen, geeft wel aan dat deze stof dus enigszins persistent moet zijn.

2.8 Conclusies literatuuronderzoek

Over de omzetting van pyrazool zelf is weinig bekend in de literatuur. Pyrazoolderivaten en/of isomeren zijn wel onderzocht, en in veel gevallen blijken deze redelijk tot goed biodegradeerbaar (60-80%), al hangt dit ook wel af van de omstandigheden. Het blijkt echter in de meeste gevallen dat bij biodegradatie de pyrazoolring zelf vaak in tact blijft, en dus blijkbaar lastiger om te zetten is. De bacteriesoort *Pseudomonas acidovorans* lijkt de ringstructuur wel te kunnen afbreken.

Het literatuuronderzoek laat zien dat omzetting van pyrazool zelf mogelijk lijkt, maar dit is tot nu toe nog niet onderzocht. Doordat deze informatie over de mogelijke biodegradatie van pyrazool ontbreekt in de literatuur, is aanvullend experimenteel onderzoek nodig. Dit rapport tracht deze ontbrekende informatie in de literatuur te achterhalen door middel van het bestuderen van pyrazool verwijdering in de full-scale zuiveringen (H3) en aanvullend experimenteel onderzoek (H4).

3 Full-scale data

De resultaten van de pyrazool analyses in de full-scale zuivering en voor additionele lab-schaal experimenten uitgevoerd door de drinkwaterbedrijven worden in dit hoofdstuk gepresenteerd. Deze data is verkregen uit de databases van de drinkwaterbedrijven, analyse methodes zijn onderling niet vergeleken, data zijn gebruikt zoals ontvangen.

3.1 Waternet

Waternet heeft de verwijdering van pyrazool in de drinkwaterzuivering onderzocht en hieruit kan geconcludeerd worden dat coagulatie (locatie Nieuwegein) geen effect heeft (<10%), maar het daarop volgende snelfiltratie proces in Nieuwegein wel (83,3% pyrazool verwijdering, standaard deviatie = 5,7%, 10 influent en 7 effluent metingen). Mogelijk is de microbiële populatie aanwezig in het snelfilter in staat pyrazool biologisch af te breken. Na het coagulatie/snelfiltratie proces wordt het water naar de duinen getransporteerd waar het gemiddeld 60 dagen zal verblijven. Hierna wordt het water geozoniseerd op locatie Leiduin. Oxidatie met ozon (133 g/m³) bleek ook geen effect te hebben op pyrazool verwijdering (<10%). De combinatie van ontharding, biologische actief kool filtratie (BAKF) en/of langzame zandfilters (LZF) verwijdert ook pyrazool (ongeveer 74%).

Tevens zijn er experimenten verricht door twee middelbare scholieren naar de verwijdering van pyrazool op nieuwe verse kool (88% verwijdering) en oude ingewerkte kool (6% verwijdering) en heeft Roy Wiersma onderzocht wat het aandeel in pyrazool verwijdering is van coagulatie/snelfiltratie (5%/95%).

3.2 Dunea

Dunea heeft de verwijdering van pyrazool onderzocht met zowel coagulatie/poederkool in bekerglasproeven als in de geavanceerde oxidatie proefinstallatie. Bekerglasproeven met ijzerdosering lieten zien dat coagulatie geen effectief proces is voor pyrazoolverwijdering (<10%). De proefinstallatie voor geavanceerde oxidatie in Bergambacht liet een 85% verwijdering van pyrazool zien met O₃/H₂O₂ (O₃ = 1,5 mg/L, H₂O₂ = 6 mg/L) en een 91% verwijdering met O₃/H₂O₂/UV (O₃ = 1,5 mg/L, H₂O₂ = 6 mg/L, UV = 0,24 kWh/m³; lagedrukklampen). Bekerglasproeven met 2, 5 of 10 mg/L verse poederkool (Norit SA Super, contacttijd 26 minuten) leverde een pyrazoolverwijdering van 20%, 46% of 60%, respectievelijk. Dit resultaat werd bevestigd door full-scale data waarbij een pyrazoolverwijdering van ongeveer 28% werd bewerkstelligd met poederkooldosering. Daarnaast lijken langzame zandfilters (pyrazoolverwijdering ongeveer 90%) in de full-scale zuivering ook effectief te zijn. Hierbij moet wel in acht worden genomen dat de resultaten voor poederkool en langzame zandfiltratie berusten op slechts één meting en deze resultaten dus alleen indicatief zijn.

3.3 Evides

Laboratoriumschaal experimenten

KWR heeft in opdracht van Evides (KWR 2015.064) de verwijdering van pyrazool met UV fotolyse, chloordosering, coagulatie, en omgekeerde osmose onderzocht op laboratoriumschaal. Met UV fotolyse (middendrukklampen) bleek een pyrazoolverwijdering mogelijk variërend van 12 tot 85% afhankelijk van de UV dosis (40/70/200/500 mJ/cm²). Het toevoegen van chloor bleek geen effect te hebben, evenals coagulatie met ijzerchloride. Dit laatste bevestigt de bevindingen van Waternet. Omgekeerde osmose (met behulp van een *Hydranautics ESPA2 LD-4040* membraan) lijkt in staat om ongeveer 30-35% pyrazool te verwijderen.

Praktijkresultaten

Actieve kool (GAC) bewerkstelligt een pyrazoolverwijdering van 27% (Baanhoek), 36% (Beerenplaat), en 16% (Braakman).

Op locatie Kralingen wordt GAC voorafgegaan door een ozonstap en varieert de pyrazoolverwijdering van 29%/24%/0% (voor respectievelijk 0 g O₃/m³; 0,5 g O₃/m³; 1,2 g O₃/m³) (Evides, 2015). Opmerkelijk is dat een hogere O₃ dosis (Kralingen) leidt tot slechtere afbraak van pyrazool op kool.

Ozon blijkt in de zuivering van Evides wel effectief pyrazool te verwijderen:

- 6.5% (zonder ozondosering);
- 35% verwijdering bij een ozondosering van 0,5 g O₃/m³ en
- 72% verwijdering bij een dosering van 1,2 g O₃/m³.

Dit is tegenstrijdig met de resultaten gevonden bij Waternet. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door de verschillende samenstellingen van de watermatrix (bijv. pH, samenstelling NOM).

Daarnaast laten diverse voorzuiveringen op verschillende locaties tegenstrijdige resultaten zien wat betreft pyrazoolverwijdering. Zo wordt pyrazool niet verwijderd in de voorzuiveringen van Baanhoek (coagulatie met ijzer, opwaartse zandfiltratie, dubbellaagsfiltratie), Braakman (flotatie met PAC), Kralingen (coagulatie/sedimentatie met ijzerchloride), en Berenplaat (coagulatie/sedimentatie ijzerchloride, dubbellaagsfiltratie). Daarentegen laat de centrale voorzuivering van locaties Haamstede en Ouddorp een zeer goede pyrazool verwijdering zien van gemiddeld 92% (n=5, standaard deviatie = 4). De voorzuivering in Ouddorp/Haamstede behandelt Haringvliet water met microzeven, coagulatie (0,5 g Fe/m³) en dubbellaagsfiltratie (zand/antraciet).

UV-desinfectie blijkt weinig effectief voor de verwijdering van pyrazool.

3.4 Oasen

Oasen heeft een pyrazoolverwijdering van ong. 80 - 92% vastgesteld voor bodempassage (pyrazool concentratie altijd < 1 µg/L in monsters, verblijftijd 1 - 100 jaar). Hoewel pyrazool pas sinds Juli 2015 is aangetoond in het oppervlaktewater (De Maas), is deze stof waarschijnlijk al veel langer aanwezig in De Rijn.

Uit data van Rijkswaterstaat en PWN blijkt dat pyrazool ook aanwezig is op verschillende punten in De Rijn en in het IJsselmeer in 2 tot 14 µg/L, waaruit afgeleid kan worden dat het niet om incidentele lozingen gaat (persoonlijke communicatie Martijn Pijnappels, Rijkswaterstaat). De gevonden pyrazool concentraties in de De Rijn zijn terug te leiden naar INEOS Chempark Dormagen en een onbekende lozer bovenstrooms van Keulen. INEOS Chempark Dormagen in Duitsland loost pyrazool op De Rijn, gemeten pyrazool concentraties ter hoogte van INEOS in De Rijn lagen bij het begin van dit incident rond de 20 µg/L. Bij de grens met Nederland waren deze concentraties afgenomen tot een waarde van 12 - 13 µg/L (persoonlijke communicatie Gerard Stroomberg, RIWA).

Tevens heeft Oasen testen gedaan met RO membranen (dichtere membranen dan de eerder geteste ESPA 2 bij KWR) (Ruepert, 2016). Twee RO membranen (TM 810V (Torrax) en SW30HLRE (Dow)) zijn onderzocht op verwijdering van pyrazool en vergeleken met het eerder onderzochte ESPA 2 membraan. De membranen zijn getest in een single element unit 4" in de proefhal van Kamerik bij een recovery van 15% in een recirculatie experiment. Het influent was anaeroob grondwater met daaraan gedoseerd 50 µg/L pyrazool. Beide membranen lieten een pyrazool verwijdering van ongeveer 80% zien bij een flux en een druk van 19.8 l/mh/18.7 bar (TM 810V) en 20.4 l/mh/23.8 bar (SW30HLRE). Het ESPA 2 membraan liet een slechtere verwijdering van pyrazool zien namelijk 43.8% bij een flux van 20.1 l/mh en een druk van 11.4 bar. Ruepert (2016) rapporteert dat indien de resultaten van de TM 810V en SW30HLRE vertaald worden naar een full-scale installatie, dit resulteert in een pyrazool verwijdering van ongeveer 65%. Echter, bij de influent concentraties zoals aangetroffen in de Maas en De Rijn betekent dit dat met een single pass RO systeem de wettelijke norm van 1 µg/L niet gehaald zal worden.

3.5 PWN

PWN heeft zowel collimated beam experimenten gedaan met snel filtraat en 100 µg/L pyrazool als gekeken naar de daadwerkelijke verwijdering van pyrazool in de full-scale zuivering. Met de huidige instellingen van

de geavanceerde-oxidatieprocessen in Heemskerk en Andijk kan circa 90% pyrazool verwijderd worden (middendruk lampen ~ 500-600 mJ/cm², 10 mg/L H₂O₂). De omzetting van pyrazool gebeurt door zowel fotolyse als hydroxyl radicalen. Lage-druklampen laten geen verwijdering van pyrazool zien. Ook de combinatie UF-RO (full-scale data) lijkt geen barrière te vormen voor pyrazool.

3.6 WML

WML heeft geen data aan kunnen leveren, omdat zij op basis van het aantreffen van (eerst een onbekende stof) pyrazool de inname van Heel gestaakt hebben en idem voor de westputten van Roosteren (putten uit bedrijf). Hierdoor heeft WML geen pyrazool houdend water ingenomen.

3.7 Conclusie full-scale data pyrazool

Tabel 1 geeft een indicatief overzicht van pyrazoolverwijdering door de verschillende processen die in de zuivering onderzocht zijn. Hoewel de resultaten voor de verschillende zuiveringsprocessen bij de diverse waterbedrijven goed overeenkomen, zijn er voor ozon wel grote verschillen waargenomen. Zo wordt pyrazool met ozon bij Waternet helemaal niet verwijderd, maar is er bij Evides bij een reguliere ozondoseerconcentratie voor desinfectie van 1,2 g/m³, een goede verwijdering waar te nemen van 72%. Bij lagere ozondoseringen neemt de verwijdering van pyrazool snel af. Het verschil tussen Evides en Waternet kan mogelijk worden veroorzaakt door de verschillen in waterkwaliteit veroorzaakt door de verschillende ruw water bronnen en zuiveringsprocessen voorafgaand aan de ozonisatiestap.

TABEL 1 INDICATIEF OVERZICHT PROCESSEN EN BIJBEHORENDE EFFECTIVITEIT MET BETREKKING TOT PYRAZOOolverwijdering

Proces	Pyrazool verwijdering
Coagulatie	Laag
Chloor dosering	Laag
PAC	Laag - midden
AKF	Laag - midden
Ozon (O ₃)	Laag - midden
RO	Midden
UV (MP)	Laag - midden - hoog
Snel zandfiltratie	Hoog
Ontharding + BAKF + LZF	Hoog
O ₃ /H ₂ O ₂	Hoog
O ₃ /H ₂ O ₂ /UV	Hoog
Langzame zandfilters	Hoog
Bodempassage (1 - 100 jaar)	Hoog

Laag = <25% pyrazool verwijdering, Midden = 25-75% pyrazool verwijdering, Hoog = 75 - 100% pyrazool verwijdering.

Oxidatieprocessen, fotolyse en biologische processen lijken het meest effectief voor de verwijdering van pyrazool. De verwijdering met behulp van fotolyse/oxidatie is sterk afhankelijk van de gebruikte dosis UV/oxidator.

Met name voor de biologische processen ((biologisch) actieve-koolfiltratie, snelle-zandfiltratie, langzame-zandfiltratie, bodemprocessen) zijn grote verschillen in verwijdering op te merken. Dit kan meerdere oorzaken hebben: (i) redox condities kunnen variëren per proces, (ii) het aandeel sorptie/biodegradatie kan variëren per proces en/of (iii) de microbiële populatie aanwezig in de verschillende media is mogelijk anders in samenstelling.

Om meer informatie te krijgen over de mogelijke oorzaken van deze verschillende omzettingen in de biologische processen, zijn de eerste twee genoemde oorzaken (redox conditie en aandeel sorptie/biodegradatie) onderzocht in een kleinschalig experiment dat beschreven wordt in Hoofdstuk 4 "Verkennd experimenteel onderzoek".

4 Verkennend experimenteel onderzoek

4.1 Onderzoeksvragen

Door middel van een batch experiment met flessen is getracht de volgende twee onderzoeksvragen te beantwoorden:

1. Wat is het verwijderingsmechanisme van pyrazool, sorptie of biodegradatie?
2. Onder welke redox conditie(s) (aeroob/anaeroob) wordt pyrazool afgebroken?

4.2 Opzet experiment

Om vast te stellen welke verwijderingsmechanismes verantwoordelijk zijn voor de afbraak van pyrazool en onder welke redox condities dit mogelijk is, zijn glazen flessen van 1 L gevuld met een minerale zouten-medium (gespiked met pyrazool) en aangevuld met materiaal van verschillende biologische media (snelle-zandfilter, oeverfiltratiezand, actieve-kool, actief-slib).

4.2.1 Locaties biologische media uit de zuivering

In dit experiment zijn vijf verschillende biologische mediamaterialen van verschillende zuiveringsprocessen gebruikt. De bedrijven, locaties en processen waar deze media zijn verkregen worden weergegeven in Tabel 2.

TABEL 2 – LOCATIES EN PROCESSEN BIOLOGISCHE MEDIA

Bedrijf	Locatie	Zuiveringsproces	Ouderdom/looptijd materiaal
WML	Heel	Oeverfiltratie	Genomen bij de start van pyrazool experiment
Evides	Ouddorp	Snelfilter	Niet te achterhalen, filters spoelen 1 x per 24 uur ^a
Evides	Actieve-kool	Braakman	40.000 BV ^a
Evides	Actieve-kool	Beerenplaat	20.000 BV ^a
Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden	RWZI Nieuwegein	Actief-slib	-

^a persoonlijke communicatie met Rob van der Leer

4.2.2 Groei-experimenten op pyrazool

Het concept van de batchproef is gebaseerd op de BDOC-test (Joret *et al.*, 1991), een methode ontwikkeld om de biologische afbreekbaarheid van DOC in water te meten. Van elk biologisch mediummateriaal is 150 gram genomen waaraan 450 mL standaardoplossing is toegevoegd (water : sediment volume ratio tussen 3:1 en 4:1) volgens de OECD 308 richtlijnen voor het bepalen van de aerobe en anaerobe transformatie van chemische stoffen in aquatische sediment systemen (OECD, 2002).

De standaardoplossing bestond uit een steriel mineraal medium + 5 mg/L NO₃ (oplossing A) of een niet-steriel mineraal medium + 10 mg/L acetaat + 1 mL rivier water + 5 mg/L NO₃ (oplossing B). Voor de precieze samenstelling van het mineraal medium zie Bijlage I. Aan de flessen met biologisch medium en standaardoplossing A of B werd 25 µg/L pyrazool gedoseerd. In de regel is de pyrazool concentratie in het rivier water lager. Er is gekozen voor een start concentratie van 25 µg/L, omdat de detectiegrens gelijk is aan 0,25 µg/L. Bij een startconcentratie van 25 µg/L is het dan nog steeds mogelijk een 99% verwijdering vast te stellen. Flessen werden geïncubeerd bij 25°C in het donker om eventuele fotolyse van pyrazool te voorkomen. Aan het einde van het experiment (na 28 dagen) is in alle flessen de concentratie pyrazool bepaald om zo de verwijdering te kunnen bepalen. Voor de blanco's is de pyrazool concentratie ook aan het begin van het experiment vastgesteld. Voor dit experiment is getracht optimale condities te creëren voor de afbraak van pyrazool, dit betekent een relatief hoge temperatuur (25°C) en de dosering van acetaat zodat bacteriën voldoende voedsel hebben om in leven te blijven gedurende het experiment. De achterliggende gedachte is

dat als pyrazool onder deze optimale condities niet wordt afgebroken, het zeer onwaarschijnlijk is dat dit in de zuivering wel gebeurt.

De flessen zijn steriel gemaakt door middel van autoclaveren (15 minuten bij 121° Celsius). ATP analyses zijn gedaan om vast te stellen in hoeverre de microbiële populatie geïnactiveerd is. ATP analyses zijn uitgevoerd zoals beschreven in (Magic-Knezev *et al.*, 2004). Anaerobe condities zijn verkregen door de flessen door te blazen met N₂ om zo het aanwezige zuurstof te verwijderen, en te incuberen in een anaerobe ruimte. Deze flessen werden regelmatig handmatig geschud, ook om de aerobe cultures te beluchten. De redox-condities worden beoordeeld door het nitraatgehalte in de flessen te meten. Een afname in de nitraatconcentratie tussen de start en het eind van het experiment is een indicatie voor anaerobe (nitraat reducerende) condities.

4.2.3 Experimentele condities

Drie experimentele condities konden worden onderscheiden: steriel aeroob, aeroob en anaeroob. Het aandeel sorptie en biodegradatie in de verwijdering van pyrazool kon vastgesteld worden door de steriele aerobe fles te vergelijken met de niet-steriele aerobe fles. In de steriele aerobe fles kan alleen sorptie van pyrazool plaatsvinden, terwijl in de niet-steriele aerobe fles zowel sorptie als biodegradatie plaats kan vinden. Door de verwijdering in de steriel aerobe flessen te bepalen was het mogelijk het aandeel sorptie in pyrazool verwijdering vast te stellen. Het verschil in pyrazoolverwijdering tussen de aerobe fles en de steriele aerobe fles wordt toegeschreven aan aerobe biodegradatie.

Het effect van de redoxconditie op de afbraak van pyrazool wordt bepaald door de resultaten van de anaerobe fles te vergelijken met de steriele aerobe fles. Het verschil in pyrazoolverwijdering tussen de anaerobe en de steriele aerobe fles wordt toegeschreven aan anaerobe biodegradatie.

Een overzicht van de experimentele condities is weergegeven in Tabel 3.

TABEL 3 – OVERZICHT EXPERIMENTELE CONDITIES BATCH EXPERIMENT PYRAZOL

Fles	Medium	Redox	Oplossing ¹	Biotisch/abiotisch
1	Blanco	Aeroob	A	Abiotisch
2	SF zand Ouddorp	Aeroob	A	Abiotisch
3	Nieuwegein slib RWZI	Aeroob	A	Abiotisch
4	Oeverzand Heel	Aeroob	A	Abiotisch
5	GAC Braakman	Aeroob	A	Abiotisch
6	GAC Beerenplaat	Aeroob	A	Abiotisch
7	Blanco	Aeroob	B	Biotisch
8	Blanco	Aeroob	B	Biotisch
9	SF zand Ouddorp	Aeroob	B	Biotisch
10	SF zand Ouddorp	Aeroob	B	Biotisch
11	Nieuwegein slib RWZI	Aeroob	B	Biotisch
12	Nieuwegein slib RWZI	Aeroob	B	Biotisch
13	Oeverzand Heel	Aeroob	B	Biotisch
14	Oeverzand Heel	Aeroob	B	Biotisch
15	GAC Braakman	Aeroob	B	Biotisch
16	GAC Braakman	Aeroob	B	Biotisch
17	GAC Beerenplaat	Aeroob	B	Biotisch
18	GAC Beerenplaat	Aeroob	B	Biotisch
19	Blanco	Anaeroob	B	Biotisch
20	Blanco	Anaeroob	B	Biotisch
21	Nieuwegein slib RWZI	Anaeroob	B	Biotisch
22	Nieuwegein slib RWZI	Anaeroob	B	Biotisch
23	Oeverzand Heel	Anaeroob	B	Biotisch
24	Oeverzand Heel	Anaeroob	B	Biotisch

¹Oplossing A: steriel mineraal medium + 5 mg/L NO₃

Oplossing B: mineraal medium + 10 mg/L acetaat + 1 mL rivier water + 5 mg/L NO₃

4.2.4 Pyrazool analyse

Het te analyseren monster wordt eerst gefiltreerd over een 0,20 µm filter. Vervolgens wordt een interne standaard toegevoegd aan het monster. De analyse wordt uitgevoerd door middel van “reversed phase” chromatografie (C18), waarbij het watermonster na filtratie direct op de UHPLC-QToF hoge resolutie massaspectrometer geïnjecteerd wordt. Voor oppervlaktewater monsters is de meetonzekerheid 4.7% en de rapportagegrens 0.5 µg/L.

4.3 Resultaten experiment

4.3.1 ATP

Figuur 17 tot en met Figuur 21 laten de ATP concentraties zien in de flessen met biologisch medium op verschillende tijdstippen. $T = 0$ (gemiddelde van twee flessen) geeft de ATP concentratie in het filtermediamateriaal aan de start van het experiment. De steriele, aerobe en anaerobe kolommen geven de ATP concentratie voor die condities weer aan het einde van het experiment. Voor het oeverzand, actief-slib en actieve-kool (Berenplaat) is de ATP concentratie in de steriele flessen lager (1 – 3 log lager) dan in de niet-steriele batches op $T = 0$. Voor deze biologische media kan dus worden aangenomen dat in de steriele batches voornamelijk sorptie plaatsvindt en biodegradatie zeer minimaal zal zijn, maar niet uit te sluiten.

Voor de flessen gevuld met het snelle-zandfilter en actieve kool (Braakman) zijn de ATP concentraties in de steriele flessen toegenomen tijdens de incubatie tot een niveau boven de $T=0$ waarde. Deze resultaten laten zien dat ook in de “steriele” flessen sprake is geweest van microbiologische processen. Ook de waarneming dat in de steriele flessen van het oeverzand en het actief slib nitraat volledig was afgebroken (tabel 2) maakt duidelijk dat de biologische inactivatie onvolledig was. De oorzaak hiervan kan liggen in een niet volledige sterilisatie (bij normale sterilisatie in een autoclaaf is dit niet aannemelijk), of door contaminatie van de steriele flessen, bv. door het gebruik van niet steriele parafilm voor het afdichten van de flessen. Van de andere kant is een contaminatie tijdens de experimentele opzet onwaarschijnlijk omdat dit effect dan ook terug te zien zou moeten zijn voor het actief-slib, het oeverzand en actieve kool (Berenplaat), en dat is niet het geval.

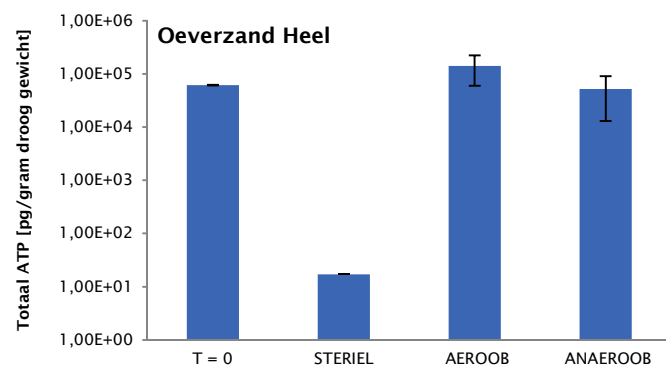
Verder is te zien dat voor actief-slib en GAC (Berenplaat) de ATP concentraties afnemen gedurende het experiment, wat duidt op afsterving van micro-organismen. Deze afsterving wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een tekort aan nutriënten (die éénmalig gedoseerd zijn aan het begin van het experiment). Voor de overige filtermediamaterialen blijven de ATP concentraties min of meer gelijk tijdens het experiment en blijft de microbiële populatie dus op hetzelfde activiteitsniveau. Over het algemeen komen de waardes van de duplo's goed overeen (standaarddeviaties zijn klein, zie Figuur 17 tot en met 21), wat impliceert dat de resultaten betrouwbaar zijn.

4.3.2 DOC, NO_3 en N

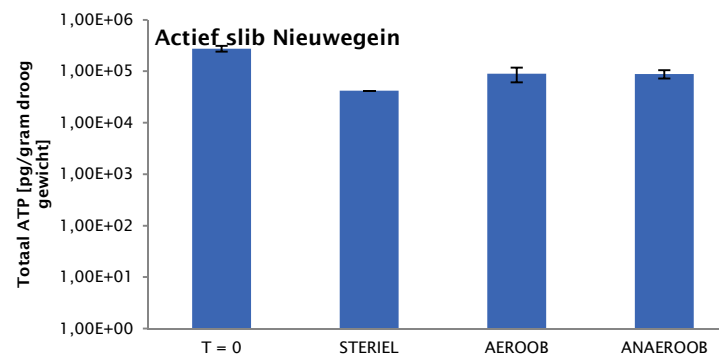
DOC, NO_3 en N concentraties zijn weergegeven in Tabel 4. Voor de steriele flessen zijn de DOC concentraties in de waterfase erg hoog (46 – 470 mg/L) in vergelijking met de oplossing die er aan toegevoegd is (DOC = 0,60 mg/L). Dit kan mogelijk worden veroorzaakt zijn door het autoclaveren van de flessen. Het autoclaveren van het filtermediamateriaal kan er voor zorgen dat het organisch materiaal loslaat van de biologische media en daardoor in de waterfase terecht komt. Ook kan het vrijkomen van het organisch materiaal van de verschillende media veroorzaakt worden door een verschuiving van het evenwicht (geen organisch materiaal aanwezig in de waterfase aan het begin van het experiment). Onder anaerobe condities is ook te zien dat de DOC concentratie in het actief-slib toeneemt gedurende het experiment, terwijl dit niet gebeurt voor het oeverzand. In de overige flessen is de DOC concentratie in de lijn de verwachting.

Om vast te stellen of de beoogde redoxcondities daadwerkelijk gehaald zijn, is de nitraat concentratie bepaald. Voor alle anaerobe flessen is de nitraatconcentratie beneden de detectielimiet, waaruit geconcludeerd wordt dat anaerobe condities in deze flessen aanwezig zijn. Ook onder aerobe condities is de nitraat concentratie voor het actief-slib en het oeverzand beneden de detectielimiet. Dit laat zien dat de

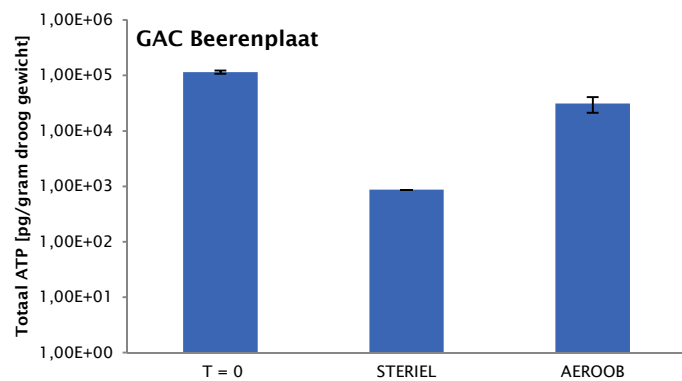
handmatige beluchting van de flessen onvoldoende is geweest om anaërobie te voorkomen, zelfs bij de steriele flessen van actief slib en oeverzand zonder acetaat, waar voldoende organisch afbreekbaar materiaal aanwezig was voor volledige nitraatafbraak.



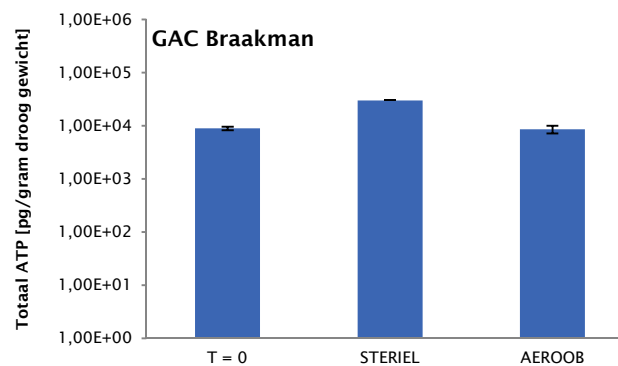
FIGUUR 17 – ATP CONCENTRATIES OEVERZAND (LOCATIE HEEL)



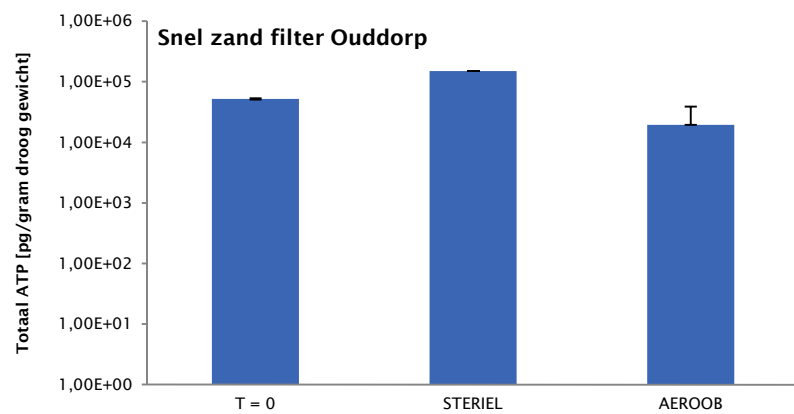
FIGUUR 18 – ATP CONCENTRATIES ACTIEF-SLIB (LOCATIE NIEUWEGEIN)



FIGUUR 19 – ATP CONCENTRATIES ACTIEVE KOOL FILTER (LOCATIE BEERENPLAAT)



FIGUUR 20 – ATP CONCENTRATIES ACTIEVE KOOL (LOCATIE BRAAKMAN)



FIGUUR 21 – ATP CONCENTRATIES SNEL ZAND FILTER (LOCATIE OUDDORP)

4.3.3 Pyrazool verwijdering

De verwijdering van pyrazool in de flessen gevuld met verschillende biologische media is weergegeven in Tabel 4. Over het algemeen is de totale pyrazoolverwijdering (sorptie en biodegradatie) onder aerobe condities hoog voor alle onderzochte biologische mediamaterialen namelijk 46-99%.

De ATP resultaten hebben laten zien dat alleen voor het actief-slib, het oeverzand en actieve kool (Berenplaat), in de steriele flessen de microbiologie grotendeels was geïnactiveerd. Aangezien de flessen met oeverzand Heel en actief slib geen nitraat meer bevatten kan niet worden uitgesloten dat hierin nog biomassa aanwezig was. Hierdoor is biodegradatie van het pyrazool niet volledig uit te sluiten. Voor deze mediamaterialen kan worden geconcludeerd dat in de steriele flessen nagenoeg alleen sorptie van pyrazool heeft plaatsgevonden. Sorptie van pyrazool aan het actief-slib of oeverzand zorgt voor een maximale verwijdering van ongeveer 20%, terwijl sorptie aan het actieve kool (Berenplaat) hoger is met ongeveer 46%. Het hoger aandeel sorptie voor actieve kool is mogelijk het resultaat van de meer poreuze structuur van actieve kool in vergelijking met zand/slib. ATP concentratie op de verschillende materialen kan de verschillen in pyrazool sorptie niet verklaren. Zo is de ATP concentratie in het actief-slib het hoogst, gevolgd door GAC Beerenplaat, gevolgd door oeverzand Heel. Sorptie aan zand of actieve-kool kan een redelijk deel van de pyrazoolverwijdering bewerkstelligen. Hierbij moet worden opgemerkt dat sorptie hier een combinatie is van sorptie aan het kool zelf alsook aan de biomassa gehecht aan het kool.

Door de pyrazoolverwijdering in de niet-steriele fles te vergelijken met die in de steriele fles, kan het aandeel pyrazoolverwijdering door biodegradatie vastgesteld worden. Onder niet-steriele aerobe condities is de pyrazoolverwijdering ongeveer 85% voor actief-slib, 46% voor oeverzand en 75% voor actieve-kool. Deze pyrazoolverwijdering is 26 tot 65% hoger dan voor de steriele flessen. Biodegradatie is dus verantwoordelijk voor een aanzienlijk deel van de pyrazoolverwijdering. Aangezien bij de niet-steriele flessen biodegradatie niet volledig kan worden uitgesloten, is het in theorie mogelijk dat het aandeel sorptie wordt overschat, en dat de omstandigheden voor biodegradatie, door toevoeging van 10 mg acetaat/L, toch relatief gunstig waren.

Onder anaerobe condities is voor actief-slib slechts een minimale toename in pyrazool verwijdering waar te nemen (5%) ten opzicht van de steriele aerobe fles. Voor het oeverzand wordt geen verschil in verwijdering geobserveerd tussen de steriele aerobe fles en de anaerobe niet-steriele fles. Hiermee wordt aangetoond dat biodegradatie van pyrazool onder aerobe condities beter verloopt dan onder anaerobe condities.

Het actieve koolmonster op locatie Berenplaat is genomen na 20.000 BV en op locatie Braakman na 40.000 BV. Pyrazoolverwijdering in actieve kool filtermateriaal van Beerenplaat is 75% en in actieve-koolfiltermateriaal van Braakman 90%. De verhoogde pyrazoolverwijdering in het actieve-koolfiltermateriaal van locatie Braakman is mogelijk het resultaat van een langere looptijd van het filter.

N.B. Het was niet het doel van dit onderzoek om de afbraaksnelheid van pyrazool, en de condities die deze beïnvloeden, vast te stellen.

Voor het actieve kool (Braakman) en het snelle-zandfilterzand (Ouddorp) kon door besmetting van de monsterfles of het ATP monster tijdens analyse geen onderscheid worden gemaakt tussen sorptie en biodegradatie. Daarom kan voor deze twee media alleen

geconcludeerd worden dat de combinatie van sorptie en biodegradatie een aanzienlijke verwijdering van pyrazool bewerkstelligt (89 – 99%). Vanuit het oogpunt van drinkwaterproductie is dit een hoopgevend resultaat, want blijktbaar is het in de praktijk toch mogelijk om een redelijk tot goede verwijdering van pyrazool te bewerkstelligen via sorptie/biodegradatie. Uit de literatuurgegevens was dit niet duidelijk naar voren gekomen, omdat hierbij meestal juist de pyrazoolring intact leek te blijven.

De verwachting was dat het actief-slib niet of nauwelijks blootgesteld zou zijn aan pyrazool en daarom was het zeer interessant om te onderzoeken of dit medium toch in staat was pyrazool te verwijderen. Het slib blijkt zeer goed in staat pyrazool te verwijderen en doet qua prestatie niet onder voor actieve-kool dat waarschijnlijk blootgesteld is aan hogere pyrazool concentraties.

TABEL 4 – PYRAZOOLVERWIJDERING, DOC EN NITRAAT (NO₃ EN N) METINGEN BEPAALD AAN HET EINDE VAN HET EXPERIMENT

Fles nr. (-)	Exp. Conditie (-)	Biologisch medium (-)	Verwijdering pyrazool (%)	DOC (mg C/L)	NO ₃ (mg/L)	N (mg/L)
1	Steriel	Blanco	1,2	0,60	5,85	1,32
2	oplossing A	SF zand Ouddorp	46,6	115	59,3	13,4
3	Aeroob	Nieuwegein slib RWZI	18,6	470	< 1,0	< 0,2
4		Oeverzand Heel	19,4	140	< 1,0	< 0,2
5		GAC Braakman	84,4	46	49,9	11,3
6		GAC Beerenplaat	45,7	170	66,5	15
7	oplossing B	Blanco	6,4	1,1	4,05	0,915
8	Aeroob	Blanco	5,6	0,87	4,00	0,904
9		SF zand Ouddorp	98,9	3,8	14,6	3,31
10		SF zand Ouddorp	98,9	3,6	17,4	3,93
11		Nieuwegein slib RWZI	86,7	31	< 1,0	< 0,2
12		Nieuwegein slib RWZI	83,7	30	< 1,0	< 0,2
13		Oeverzand Heel	46,4	5,7	< 1,0	< 0,2
14		Oeverzand Heel	46,4	5,1	< 1,0	< 0,2
15		GAC Braakman	89,0	7,5	4,06	0,917
16		GAC Braakman	89,4	7,9	4,19	0,947
17		GAC Beerenplaat	74,9	20	2,38	0,537
18		GAC Beerenplaat	74,8	20	3,17	0,717
19	oplossing B	Blanco	6,8	3,0	< 1,0	< 0,2
20	Anaeroob	Blanco	9,6	3,2	< 1,0	< 0,2
21		Nieuwegein slib RWZI	26,2	110	< 1,0	< 0,2
22		Nieuwegein slib RWZI	24,0	95	< 1,0	< 0,2
23		Oeverzand Heel	14,8	4,7	< 1,0	< 0,2
24		Oeverzand Heel	18,3	4,5	< 1,0	< 0,2

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Hoewel er in de literatuur maar weinig bekend is over de omzetting van pyrazool, zijn pyrazoolderivaten en/of -isomeren wel onderzocht. Omzetting lijkt mogelijk maar in de meeste gevallen blijft de pyrazoolring intact.

Op basis van de experimentele en full-scale data verkregen van de drinkwaterbedrijven is duidelijk geworden dat oxidatieprocessen, fotolyse en biologische processen het meest effectief zijn voor de verwijdering van pyrazool. De verwijdering met behulp van fotolyse/oxidatie is sterk afhankelijk van de gebruikte dosis UV/oxidator. Met name voor de biologische processen ((biologisch) actieve kool, snelle-zandfiltratie, langzame-zandfiltratie, bodemprocessen) zijn grote verschillen in verwijdering op te merken. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de variaties in de mate van sorptie en/of biodegradatie van pyrazool in deze processen of verschillen in blootstellingsduur/concentratie.

Tenslotte is met een kleinschalig batchexperiment gekeken naar de volgende twee onderzoeksvragen:

1. Wat is het verwijderingsmechanisme van pyrazool, sorptie of biodegradatie?
2. Onder welke redox conditie(s) (aeroob/anaeroob) wordt pyrazool afgebroken?

De gehanteerde experimentele aanpak geeft relatief snel meer inzicht in de verwijdering van pyrazool. Biodegradatie lijkt een belangrijk proces hierbij te zijn, maar een bijdrage van sorptie kan zeker niet worden uitgesloten. Geconcludeerd kan worden dat onder aerobe condities pyrazool wordt verwijderd in oeverfiltratiezand, zand uit een snelfilter, actief slib en actieve kool. Opvallend was dat de mate van verwijdering verschillend was onder aerobe condities. Hiervoor is een aantal mogelijke redenen te noemen:

- i. Verschillende bijdrage van sorptie
- ii. Verschillende samenstelling van de bacteriepopulatie
- iii. Verschillen in afbraaksnelheid in de diverse cultures door sub-optimale condities zoals substraatuitputting bij mogelijke co-metabolische afbraak.

Verwijdering onder anaerobe condities verloopt minder efficiënt. Redoxcondities hebben dus een duidelijk effect op de biodegradatie van pyrazool.

5.2 Aanbevelingen

De meeste drinkwaterbedrijven in Nederland hebben één of meerdere van de onderzochte biologische processen in hun zuivering staan. De kennis over hoe deze processen reageren op pyrazool levert dus meer inzicht in de effectiviteit van deze processen met betrekking tot deze stof. Deze kennis is zeer nuttig, zeker in het kader van het vervangen/uitbreiden van (delen) van zuiveringen om een barrière te vormen voor deze organische microverontreinigingen. In hoeverre de huidige zuivering effectief is voor de verwijdering van pyrazool hangt van lokale condities af, maar is hier niet onderzocht.

De belangrijkste vraag die nu open staat is waarom ogenschijnlijk gelijke processen (snelfiltratie) verschillen in pyrazool afbraak laten zien. Zo lijken de snelfilters bij Dunea geen pyrazool af te breken, maar wordt pyrazool in de snelfilters van Waternet (locatie

Nieuwegein) zeer goed afgebroken. Om deze vraag te kunnen beantwoorden, wordt aanbevolen de volgende vragen te onderzoeken.

- (1) *Het inventariseren van de parameters (bijv. temperatuur, DOC concentratie, pH, etc.) die effect kunnen hebben op de microbiële populatie en daarmee pyrazool omzetting;*
- (2) *Onderzoeken wat het effect is van proces parameters, de waterkwaliteit en/of enten op afbraak van pyrazool in kolomexperimenten op locatie;*
- (3) *Het vaststellen van de bacterie(soort) die verantwoordelijk is voor pyrazool degradatie onder gecontroleerde condities in een ophopingsexperiment.*

In een eerste stap zullen parameters die van invloed zijn op de pyrazool verwijdering voor de diverse processen en bedrijven naast elkaar gelegd worden. Deze meer gedetailleerde analyse van procescondities zal meer inzicht geven in de te onderzoeken parameters in het kolom onderzoek op locatie. Tevens zullen de verschillende analysetechnieken van de diverse laboratoria voor pyrazool vergeleken worden.

In het kolomonderzoek kan met behulp van een diagnosetool onderzocht worden (1) wat het effect is van procesparameters (temperatuur, pH, filtratiesnelheid) op de microbiële populatie en dus pyrazool verwijdering, (2) het effect van de waterkwaliteit op de microbiële populatie en dus pyrazool verwijdering en (3) of het mogelijk is een filter waarin geen pyrazool afbraak plaatsvindt te enten met materiaal uit een filter dat wel pyrazool afbreekt. Indien dit laatste mogelijk blijkt, kunnen drinkwaterbedrijven elkaar onderling "helpen" met het pyrazool probleem op een relatief goedkope manier. De diagnosetool is een opstelling van 6 kolommen ($D = 12.5$ cm) die gevuld kunnen worden met verschillende filtermaterialen (van pyrazool afbrekende filters en niet-pyrazool afbrekende filters) en op diverse locaties getest kunnen worden om bovengenoemde vraagstukken te beantwoorden.

Door middel van ophopingsexperimenten (uitgevoerd onder gecontroleerde laboratorium condities) kan vastgesteld worden (i) welke bacteriën verantwoordelijk zijn voor de afbraak van pyrazool en (ii) of het gaat om directe metabole afbraak of co-metabole afbraak, als onderdeel van de afbraak van makkelijk afbreekbare stoffen worden zogenaamde ophopingsproeven uitgevoerd. De ophopingsexperimenten zullen daarmee dienen als een onderbouwing van het kolom onderzoek. Als stoffen metabool worden afgebroken en tijdelijk niet aanwezig zijn in het water, zullen deze bacteriën hoogstwaarschijnlijk afsterven. Echter, als deze stoffen co-metabool worden afgebroken, worden ze als het ware bij "toeval" meegenomen in het afbraakproces en zal een tijdelijke afwezigheid van deze stoffen in het water geen grote gevolgen hebben. Indien pyrazool dus co-metabool wordt afgebroken, zal dit een robuuster biologisch proces opleveren dan wanneer de stoffen metabool worden afgebroken. Organische microverontreinigingen zijn niet altijd aanwezig in het water. Het is daarom aanbevelingswaardig om na te gaan of pyrazool (of andere microverontreinigingen) metabool of cometabool worden afgebroken en welke bacteriën verantwoordelijk zijn voor de omzetting van deze stoffen. Indien er meer inzicht is de metabole/co-metabole afbraak van pyrazool (en organische microverontreinigingen in het algemeen) en welke bacteriën hiervoor verantwoordelijk zijn, wordt het wellicht mogelijk om biologische zuiveringsprocessen te kunnen sturen/optimaliseren.

Tenslotte is het op de lange termijn mogelijk om QSARs op te stellen, die een statistisch verband kunnen aangeven tussen de stofeigenschappen/moleculaire structuur en de biodegradeerbaarheid van deze stoffen. Hiervoor zijn echter heel veel data nodig. Het

voordeel van QSARs is dat dit in de toekomst het testen van elk nieuw stofje apart overbodig zou kunnen maken.

6 Literatuur

- Beam, H. W., et al. (1974). Microbial Degradation of Cycloparaffinic Hydrocarbons via Co-metabolism and Commensalism. *Microbiology*, 82, 163-169.
- Blecher, H., et al. (1981). Bacterial degradation of aminopyrine. *Xenobiotica*, 11(11), 749-754.
- Carlsen, L., et al. (2008). A QSAR/QSTR study on the environmental health impact by the rocket fuel 1,1-dimethylhydrazine and its transformation products. *Environmental Health Insights*, 1, 11-20.
- Coote, J. G., et al. (1969). The role of Imidazol-5-yl-lactate-Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidoreductase and Histidine-2-Oxoglutarate Aminotransferase in the Degradation of Imidazol-5-yl-lactate by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochem. J.*, 111, 237-239.
- Doran, G., et al. (2009). Sorption and degradation of fipronil in flooded anaerobic rice soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10296-10301.
- Eicher, T., et al. (2012). *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications* (Vol. Third, Completely Revised and Enlarged Edition). Germany: Wiley-VCH.
- El-Sayed, R., et al. (2015). Propoxylated Fatty Thiazole, Pyrazole, Triazole, and Pyrrole Derivatives with Antimicrobial and Surface Activity. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18(4), 661-673. doi: 10.1007/s11743-015-1684-8
- Evides. (2015). Intermezzo organische microverontreinigingen- de gemiddelde verwijdering van pyrazool (sept.-nov. 2015).
- Feerman, D. E., et al. (1987). Oxidation of the alcohol dehydrogenase inhibitor pyrazole to 4-hydroxypyrazole by microsomes. Effect of cytochrome P-450 inducing agents. *Drug Metab Dispos*, 15(5), 634-639.
- Gašparac, R., et al. (1999). Corrosion Protection on Copper by Imidazole and Its Derivatives. *Corrosion*, 55(11), 1031-1039.
- Hand, L. H., et al. (2010). The behavior of isopyrazam in aquatic ecosystems: Implementation of a tiered investigation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(12), 2702-2712. doi: 10.1002/etc.337
- Hofman-Caris, R., et al. (2015). KWR 2015.064 Verwijdering van pyrazool uit oppervlaktewater KWR Watercycle Research Institute Nieuwegein. Retrieved from
- Joret, J. C., et al. (1991). Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) content of drinking water and potential regrowth of bacteria. *Wat. Sci. Tech.*, 24(2), 95-101.

- Kenessov, B., et al. (2012). Transformation products of 1,1-dimethylhydrazine and their distribution in soils of fall places of rocket carriers in Central Kazakhstan. *Science of the Total Environment*, 427-428, 78-85. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.017
- Li, Y. W., et al. (2015). *A study on the effect of [BPy]PF6 as a flame retardant property on rigid polyurethane foam*. London: Taylor & Francis Group.
- Lin, K., et al. (2008). Transformation and sorption of fipronil in urban stream sediments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8594-8600.
- Magic-Knezev, A., et al. (2004). Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Research*, 38, 3971-3979.
- Mandal, K., et al. (2013). Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 87-92. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.001
- Müller, R., et al. (1982). A Novel Non-heme Iron-Containing Dioxygenase. *Eur. J. Biochem.*, 125, 579-584.
- OECD. (2002). *Test No. 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems*: OECD Publishing.
- Pieper, C., et al. (2010). Investigation of the microbial degradation of phenazone-type drugs and their metabolites by natural biofilms derived from river water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Water Research*, 44, 4559-4569.
- Reddy, S. N., et al. (2013). Effect of moisture, organic matter, microbial population and fortification level on dissipation of pyraclostrobin in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(3), 356-361. doi: 10.1007/s00128-013-1045-0
- Ruepert, N. (2016). Verwijdering van pyrazol door zeewater RO membranen, Oasen
- Ryoo, D., et al. (2000). Aerobic Degradation of Tetrachloroethylene by Toluene-o-xylene Monooxygenase of *Pseudomonas Stutzeri* OX1. *Nat Biotechnol*, 18, 775-778.
- Saratale, G., et al. (2007). Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *J Basic Microbiol*, 47(5), 400-405.
- Shuai, X., et al. (2012). Adsorption, transport and degradation of fipronil termiticide in three Hawaii soils. *Pest Management Science*, 68(5), 731-739.
- Singh, S. B., et al. (2013). Degradation behaviour of pyrazosulfuron-ethyl in water as affected by pH. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(4), 266-271. doi: 10.1080/03601234.2013.743761
- van Ginkel, C. G., et al. (2005). Reduction of bromate to bromide coupled to acetate oxidation by anaerobic mixed microbial cultures. *Water Research*, 39, 59-64.
- Wang, Y., et al. (2012). Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by *Acinetobacter* sp. CW17. *Folia Microbiologica*, 57(2), 139-147.

Xiu-Yan, L., et al. (2013). Analyzing microbial community changes of activated sludge in bioaugmentation reactor by DGGE-PCR. *J. Pure Appl. Microbiol.* , 7(3), 2031-2035.

Xu, J., et al. (2009). Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils. *Chemosphere*, 74(5), 682-687. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.078

Zhu, G., et al. (2004). Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 153(1-4), 35-44. doi: 10.1023/B:WATE.0000019928.67686.b1

Bijlage I Samenstelling mineraal medium

Standaardoplossing minerale zouten (Hijnen et al. 1995):

Het minerale zoutmedium bevat het volgende in 1 L gedemineraliseerd water:

0.1 g Na_2HPO_4
5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0.005 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0.01 mg H_3BO_3
5 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.008 mg of $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0.3 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.01 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.3 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Hijnen, W.A.M., Voogt, R., Veenendaal, H.R., van der Jagt, H., van der Kooij, D. (1995)
Bromate reduction by denitrifying bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 61 (1),
pp. 239-244