Aalborg Universitet

AALBORG UNIVERSITY
DENMARK

Nye metoder til dokumentation af naturlig nedbrydning af oliestoffer i den umættede zone

Loll, Per; Kristensen, Andreas Houlberg; Larsen, Poul; Nielsen, Jeppe Lund; Henriksen, Kaj

Publication date:
2011

Document Version
Tidlig version også kaldet pre-print

Link to publication from Aalborg University

Citation for published version (APA):
Loll, P., Kristensen, A. H., Larsen, P., Nielsen, J. L., & Henriksen, K. (2011). *Nye metoder til dokumentation af naturlig nedbrydning af oliestoffer i den umættede zone*. Miljø- og Energiministeriet, Miljøstyrelsen.

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal -

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at vbn@aub.aau.dk providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from vbn.aau.dk on: April 17, 2024

Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Nye metoder til dokumentation af naturlig nedbrydning af oliestoffer i den umættede zone

Per Loll og Andreas Houlberg Kristensen
Dansk Miljørådgivning A/S

Poul Larsen og Jeppe Lund Nielsen
Sektion for Bioteknologi, Aalborg Universitet

Kaj Henriksen
Sektion for Miljøteknologi, Aalborg Universitet

Miljøprojekt Nr. 1392 2011

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD 5

SAMMENDRAG 7

BAGGRUND OG FORMÅL 7
UNDERSØGELSEN 7
HOVEDKONKLUSIONER 8
PROJEKTRESULTATER 8

ENGLISH SUMMARY 11

BACKGROUND AND STUDY PURPOSE 11
THE STUDY 11
MAIN RESULTS 12
PROJECT RESULTS 13

1 INDLEDNING 15

1.1 BAGGRUND 15
1.2 PRAKTISKE ERFARINGER OG UDFORDRINGER 16
1.3 FORMÅL 16

2 METODEBESKRIVELSER 17

2.1 DUAL POINT DEGRADATION (DPD) TESTEN 17
2.1.1 Princip 17
2.1.2 Feltudstyr 17
2.1.3 Databehandling 18
2.2 DIVERSITETSUNDERSØGELSE 20
2.2.1 Princip 20
2.2.2 Databehandling 22

3 LOKALITET FOR PILOTFORSØG 25

4 PILOTFORSØG: DPD-TESTEN 29

4.1 FORSØGSBETINGELSER 29
4.1.1 Jordtype og temperatur 29
4.1.2 Afvigelser fra testdesign 29
4.2 RESULTATER 29
4.2.1 Tolkning af rådata 29
4.2.2 Usikkerheder omkring opnåelse af steady-state 30
4.2.3 Estimering af nedbrydningsraten 31

5 PILOTFORSØG: DIVERSITETSUNDERSØGELSE 37

5.1 FORSØGSBETINGELSER 37
5.1.1 Jordprøver 37
5.1.2 Indhold af flygtige kulbrinter i poreluften 37
5.2 RESULTATER 38
5.2.1 Generel primer 38
5.2.2 6-OCH-CoA og PAH dioxygenase-gener i jordprøverne 42

6 DISKUSSION OG PERSPEKTIVER 45

6.1 DPD-TESTEN 45
6.1.1 Estimatet på det diffusive tab giver et konservativt rateestimat 45
6.1.2 Fysisk konfiguration af feltopstillingen 46

6.1.3 Større dybder og rumlige variationer *47*
6.1.4 Gasblandinger: Komponenter og koncentrationer *47*
6.1.5 En høj gaskoncentration i in-situ testen giver konservativt rateestimat *48*
6.1.6 Øvrige perspektiver for videreudvikling og dokumentation *49*
6.1.7 Potentiale for anvendelse sammen med JAGG 2.0 *49*
6.2 DIVERSITETSUNDERSØGELSE 50
6.2.1 Potentiale for anvendelse sammen med JAGG 2.0 *50*
6.2.2 Perspektiver for videreudvikling og dokumentation *51*
7 REFERENCER 53

Forord

Det primære formål med denne rapport er at præsentere og beskrive status og perspektiver for en ny in-situ nedbrydningstest, der kan benyttes i forbindelse med dokumentation og kvantificering af naturlig nedbrydning af oliestoffer i jordens umættede zone. Testen, der er blevet døbt "Dual Point Degradation Test" (DPD test), har specielt potentiale ift. JAGG 2.0 modulet for vertikal transport mod førstkommende grundvandsmagasin.

Et sekundært formål med projektet er at undersøge potentialet for anvendelse af nye DNA-baserede teknikker til kvalitativ dokumentation af nedbrydnings-aktivitet i områder med biologisk nedbrydning af oliekomponenter.

Projektet er gennemført i perioden august 2008 til april 2011 og udgøres i sin grundsubstans af en afprøvning/anvendelse af de nævnte metoder på en test-lokalitet, hvor der er efterladt restforurening med dieselolie.

Projektet er gennemført af Dansk Miljørådgivning A/S (DMR), i samarbejde med Aalborg Universitet, under Miljøstyrelsens Teknologipulje.

Region Nordjylland takkes for bidrag med bevilling af en IR-måler til den indledende metodeudvikling på AAU. Endvidere takkes afgangsstuderende Jakob Skov for gennemførelse af de indledende laboratorietests af metoden, samt Professor Per Møldrup og Lektor Tjalfe G. Poulsen, Sektion for Miljø-teknologi på Aalborg Universitet, for faglig sparring omkring datatolkningen for in-situ testen.

Sammendrag

Baggrund og formål

I JAGG 2.0 åbnes der op for at inddrage processerne i den umættede zone når der foretages risikovurderinger ift. grundvandet, hvilket ikke hidtil har været muligt. På lokaliteter med en kilde bestående af oliekulbrinter beliggende i den umættede zone, kan der inddrages nedbrydning under nedadrettet transport gennem den umættede zone mod grundvandet. Nedbrydningen kan inddrages på tre niveauer, hvor der på niveau 2 og 3 kræves hhv. en kvalitativ og en kvantitativ dokumentation.

For at imødegå behovet for at inddrage nedbrydningen i risikovurderinger ift. grundvandet (på niveau 2 og 3), har Miljøstyrelsen bl.a. igangsat dette teknologiprojekt. Projektet har til formål, at gennemføre pilotforsøg og evaluere to teknologier der har potentiale til anvendelse sammen med JAGG 2.0 under inddragelse af nedbrydning på niveau 2 og 3:

1) En ny metode/strategi, kaldet Dual Point Degradation test (DPD-test) til kvalitativ og kvantitativ dokumentation af naturlig nedbrydning i den umættede zone (JAGG 2.0 niveau 2 og 3).
2) Analyse af den mikrobiologiske artsdiversitet, til kvalitativ dokumentation af nedbrydning i den umættede zone (JAGG 2.0 niveau 2).

Undersøgelsen

I forbindelse med projektet har Dansk Miljørådgivning A/S (DMR) gennemført pilotforsøg med de to teknologier, hhv. DPD-testen og analyse af den mikrobielle artsdiversitet, på en testlokalitet, hvor der er efterladt en mindre dieselolieforurening.

Overordnet foretages DPD-testen ved, at der nedblæses forurening på gasform i ét punkt og oppumpes poreluft i et nabopunkt (svarende til en vandret in-situ kolonnetest, uden kolonne) etableret i den umættede zone via poreluftspyd. På baggrund af et aerobt og et anaerobt testforløb, samt en simpel analyse af gennembrudsdata for de to testforløb, dokumenteres in-situ nedbrydning og der kan estimeres en aerob nedbrydningsrate.

Diversitetsundersøgelsen er foretaget ved at udtage en række jordprøver på testlokaliteten, hhv. i restforureningen, lige ud for restforureningen i rent fyldsand (hhv. før og efter udførelse af DPD-testen) samt forskellige steder i opfyldningen og i intakte aflejringer omkring lokaliteten. Efterfølgende er DNA ekstraheret fra jordprøverne og der er lavet forskellige analyser af den mikrobielle population samt af tilstedeværelsen af forskellige funktionelle gener; hhv. gener der koder for enzymer til nedbrydning af monoaromater og polyaromater.

Hovedkonklusioner

DPD-testen
Baseret på resultaterne fra den gennemførte pilottest, vurderes DPD-testen at have et stort potentiale ift. kvalitativ og kvantitativ dokumentation af in-situ nedbrydning af oliekulbrinter i jordens umættede zone, herunder anvendelse ved udarbejdelse af risikovurderinger ved brug af JAGG 2.0.

En speciel omstændighed omkring DPD-testen er, at testen er skræddersyet til risikovurderinger og ikke til prædiktion af nøjagtige nedbrydningsrater. Derfor håndteres usikkerheder omkring testens gennemførelse og datavurderingen på en måde, som gør, at den estimerede nedbrydningsrate bliver konservativ (dvs. lavere end den faktiske nedbrydningsrate).

Valget af testudstyr og driftsbetingelser er foretaget med henblik på at udnytte erfaringerne fra den almindelige poreluftprøvetagning. Valg i forbindelse med ovenstående faktorer er foretaget med henblik på at gøre testen hurtig, operationel, simpel og omkostningseffektiv ift. eksisterende publicerede metoder /2/.

På baggrund af den stringente konservative tilgang til testudførelse og datatolkning vurderes det, at hvis der ved DPD-testen vises en målbar nedbrydning, så vil der med stor sikkerhed reelt være potentiale for nedbrydning på lokaliteten, hvilket vil være med til at skabe tillid til de risikovurderinger, der baseres på nedbrydningsdata opnået med DPD-testen.

På baggrund af de gennemførte pilottests er der opstillet en række perspektiver for anvendelse af DPD-testen i forbindelse med risikovurderinger foretaget ved brugt af JAGG 2.0.

Diversitetsanalyse
På baggrund af resultaterne fra pilot-undersøgelsen vurderes det, at metoden har et potentiale for kvalitativ identifikation af nedbrydning i umættet zone, som kan anvendes i forbindelse med udarbejdelse af risikovurderinger i JAGG 2.0 (niveau 2).

Resultaterne af diversitetsanalysen viser således, at der, for de mest forurenede jordprøver, blev detekteret gener associeret med nedbrydning af monoaromater, mens disse gener ikke blev detekteret i uforurenede referenceprøver fra samme lokalitet. Derudover viste brugen af den relativt grove Denaturerende Gradient Gel Elektroforese (DGGE) metode, at fordelingen af bånd var tilstrækkelig til at give et fingerprint, der kan illustrere en forskel i diversiteten mellem jordprøver, der har været forurenet i umættet zone og kontrolprøver uden forurening. Endvidere er der ved metoden påvist forskelle i artsdiversiteten mellem rent fyldsand og identisk fyldsand, der er lagt i en udgravning, hvorunder der forekommer grundvandsforurening, så sandet kan blive påvirket med dampe fra forureningen. Der er således indikationer på, at metoden er tilstrækkelig følsom til at registrere ændringer i substrattilførsel; her i form af dampe af gasolie fra grundvandsforureningen.

Projektresultater

DPD-testen
I projektet er fremgangsmåde og databehandling for DPD-testen beskrevet. Derudover er der foretaget en pilottest med henblik på at eftervise metodens

anvendelsesmæssige potentiale, idet den hidtil kun har eksisteret på ideplan. Endeligt opstilles en række perspektiver for det videre arbejde med metoden, hen imod en rutinemæssig anvendelse sammen med JAGG 2.0.

På den undersøgte testlokalitet er der udført en pilottest i en dybde på 1 m.u.t. og med 20 cm afstand imellem to poreluftspyd. Selve testen er udført i sandfyld og i en afstand af ca. 15 cm fra en efterladt restforurening med dieselolie. Testen er udført på et tidspunkt med ca. 17 cm frost i jorden og en jordtemperatur på ca. 7 °C. I testområdet er der konstateret tegn på naturlig nedbrydningsaktivitet i form af lave iltkoncentrationer og forhøjede CO_2-indhold i poreluften.

Selvom testen var planlagt gennemført med benzen som modelstof i en koncentration på 2.000 mg/m^3, viste kontrolanalyser af den indkøbte gas, at koncentrationen af benzen var omkring 225-255 mg/m^3, mens indholdet af øvrige kulbrinter i gasblandingen havde et kogepunktsinterval på ca. 50-70 °C. En endelig identifikation af disse kulbrinter lod sig ikke gøre - hverken ved henvendelse til gasleverandøren eller ved en efterfølgende GC-MS-analyse. Pilottesten er således gennemført med ca. 2.000 mg TVOC/m^3 i stedet for med ca. 2.000 mg benzen/m^3 (TVOC = totalkulbrinter).

På baggrund af resultaterne fra in-situ testen er der estimeret en 0. ordens nedbrydningsrate på 150 mg TVOC/dag. Ved en efterfølgende bestemmelse af testens influensradius i jorden - og hermed estimering af det "aktiverede" jordvolumen - er det anslået, at ca. 800 kg TS har været aktiveret under testen. Dermed kan ovenstående rate omregnes til en 0. ordens rate på ca. 0,19 mg TVOC/kg TS/dag, hvilket for den aktuelle testjord svarer til en rate på 2,8 mg TVOC/L/dag.

Hvis benzen anvendes som modelstof for TVOC i pilottesten, kan det, via fugacitetsberegninger for den aktuelle testjord, estimeres, at porevandskoncentrationen har været imellem 1,3 og 8,8 mg/L, svarende til koncentrationsområdet, hvor 0. ordens nedbrydning forventes for BTEX (under antagelse af en halvmætningskonstant på 0,2 mg/L). Under disse betingelser kan den estimerede 0. ordensrate omregnes til et konservativt bud på en (pseudo) 1. ordens nedbrydningsrate på i størrelsesordenen 0,32-2,2 dag^{-1}, baseret på nedbrydning i porevandet.

Uanset hvilket af ovenstående rateestimater der sammenlignes med litteraturværdier (for TVOC eller BTEX) ligger den opnåede nedbrydningsrate i den lave ende af sammenlignelige litteraturværdier. Når det tages i betragtning, at testen er udført med ukendte VOC'er, ved en (lav) temperatur på ca. 7 °C og flere konservative tilgange til datatolkningen ligger disse estimater dog i et absolut realistisk leje.

Den konservative tilgang til datatolkningen vurderes at kunne skabe den nødvendige tillid i forhold til anvendelse sammen med JAGG 2.0 ift. inddragelse af nedbrydningen i risikovurderinger overfor grundvandet.

Diversitetsanalyse

Diversitetsanalysen med DGGE teknologien viser vha. en statistisk analyse med Principal Component Analysis (PCA), at være i stand til at registrere en forskel i diversiteten mellem jordprøver der er forurenede med gasolie og rene referenceprøver fra samme lokalitet. Resultaterne indikerer således, at forskelle i forureningspåvirkningen giver resulterende forskelle i de mikrobiologiske

populationer, der er markante nok til at de kan detekteres ved DGGE-analysen. Med andre ord, opnås meget store forskelle mellem jordprøverne, også indenfor de udtagne delprøver, og en efterfølgende PCA-analyse af diversitetsprofilerne giver en relation til forureningsgraden når der anvendes generelle primere.

Ved anvendelse af primere, som er specifikt designet til at ramme genet, der koder for 6-Oxocyklohex-1-en-1-carbonyl-coenzym A hydrolase (6-OCH-CoA hydrolase) er der konstateret tegn på nedbrydning i 4 ud af 6 prøver, hvor der sandsynligvis har foregået eller foregår nedbrydning af gasoliedampe fra forureningen. Der blev ikke konstateret positive blandt referenceprøverne. I pilotprojektet er der således afdækket et potentiale for en metode, der med dette, eller andre funktionelle gener relateret til BTEX-nedbrydning, potentielt kan benyttes til en kvalitativ vurdering af nedbrydning af oliekomponenter i den umættede zone sammen med JAGG 2.0.

English Summary

Background and study purpose

In the Danish risk assessment model JAGG 2.0 it will become possible to include unsaturated zone processes in risk assessments for the ground water. This has previously not been possible. At sites with a source of petroleum hydrocarbons situated in the unsaturated zone, it will be possible to include degradation during the vertical transport through the unsaturated zone as the hydrocarbons migrate towards the ground water. In the model revision, it will be possible to include degradation at three different levels, where level 2 and 3 require a qualitative or quantitative documentation, respectively.

In order to accommodate the need for including degradation in ground water risk assessments (at level 2 and 3) the Danish EPA as initiated this project, among others. The purpose of this project is to carry out pilot testing and evaluate two technologies with potential for application in the context of unsaturated zone degradation and JAGG 2.0:

1) A novel method/strategy called the Dual Point Degradation test (DPD-test) for qualitative and quantitative documentation of intrinsic degradation in the unsaturated zone (JAGG 2.0 level 2 and 3).
2) Analysis of the microbial species diversity of soil samples for qualitative documentation (JAGG 2.0 level 2).

The study

During the project, Dansk Miljørådgivning A/S (DMR A/S) has performed pilot tests with the two technologies, the DPD-test and an analysis of the microbial species diversity, at a test site with a minor residual contamination of diesel oil.

The DPD-test is performed by injecting a gaseous target oil component into the unsaturated zone in one point and pumping it up in an adjacent point (corresponding to a horizontal in-situ column test without a column). The injection and extraction points are established using aluminum soil vapor sampling rods/equipment. Based on successive aerobic and anaerobic tests, and a simple analysis of the break through data, the presence of in-situ degradation activity is documented and an aerobic degradation rate can be estimated.

The microbial diversity analysis is performed by extracting soil samples from the test site at different locations; from the area with residual contamination (intact fill material), from clean sand fill right next to the residual contamination (before and after the DPD-test was performed), and from several locations within the sand fill and from intact sediments around the test site, with varying degrees of possible contaminant presence. Subsequently, microbial DNA was extracted from the soil samples and different analyses of the microbial population have been carried out (DGGE and PCR). Within this frame work different functional genes coding for degradation of monoaromatics and polyaromatics has been targeted.

Main results

The DPD-test
Based on the results of the pilot test the DPD-test is expected to have a large potential for qualitative and quantitative documentation of in-situ degradation of petroleum hydrocarbons in the unsaturated zone, also for use with ground water risk assessments performed using JAGG 2.0 (level 2 and 3).

A special circumstance concerning the DPD-test is that the test and data treatment has been tailored for use with risk assessments and not for prediction of exact degradation rates. Hence, uncertainties regarding the test conditions and data treatment are handled in a manner that results in a conservative degradation rate estimate; i.e. lower that the actual degradation rate.

Choices of test equipment and test conditions are made with focus on application of regular soil vapor sampling procedures. Thus choices are made with focus of establishing a swift, operational, simple and cost effective sampling and data analysis procedure, compared to other existing methods and procedures /2/.

Because of a stringent conservative approach to the test procedure and data interpretation we believe that when the DPD-test indicates a measurable degradation it is very likely that a significant degradation takes place at the test site. This will provide a good sense of confidence to risk assessments based on degradation rates obtained using the DPD-test.

Based on the pilot testing, a number of perspectives for the further development and application of the DPD-test has been outlined. Especially perspectives directed at use within the JAGG 2.0 frame work.

Microbial Diversity Analysis
Based on the results of the microbial diversity analysis the microbial diversity analysis has a potential for qualitative documentation of in-situ degradation of petroleum hydrocarbons in the unsaturated zone, also for use with ground water risk assessments performed using JAGG 2.0 (level 2).

The results show that for the most contaminated soil samples, genes associated with degradation of monoaromatics were detected, while these genes were not detected in non-contaminated reference samples collected at the same site. Moreover, the relatively coarse Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) method showed that the distribution of visible bands between the different samples was sufficient to give a fingerprint able to illustrate the difference in microbial diversity.

Also, differences between results from uncontaminated off-site sand fill material and on-site sand fill from the back filled excavation (with an underlying groundwater plume) was evident. Overall, the results indicate that the method is sufficiently sensitive to detect differences in substrate access; here in the form of diesel oil components volatilized from a groundwater plume.

The DPD-test
The DPD-test procedure and data analysis strategy is described in the project. Also, a pilot test has been performed in order to show the practical potential of the method, since – so far – it has only existed as an intellectual idea. Finally, a number of concrete perspectives for future development of the method has been outlined – perspectives that could well lead to a routinely application of the DPD-test with JAGG 2.0 risk assessments.

At the pilot test site, testing was performed at a depth of 1 m b.g.l. and with a distance of 20 cm between the injection and extraction points. The pilot test was performed in a sand filled excavation only 15 cm from a residual contamination with diesel oil left at the site. Testing was carried out with 17 cm frozen soil and with a soil temperature of 7°C. Intrinsic biodegradation at the site was suggested by lowered oxygen and elevated carbon dioxide concentrations.

The test was planned to be performed with benzene as the only model component at a concentration of 2.000 mg/m^3, but control analysis of the purchased gas showed that the benzene concentration was around 225-255 mg/m^3 while the TVOC concentration (with boiling points of 50-70°C) was about 2.000 mg/m^3. A final identification of these other VOCs was not possible, neither by the gas company nor by the lab sent a sample for GS-MS testing. Hence, the pilot test was performed with 2.000 mg TVOC/m^3.

Based on the results of the pilot test, we estimated a zero-order degradation rate of 150 mg TVOC/d. By estimating the influence radius of the pilot test, is was estimated that approx. 800 kg dry soil was activated during the pilot test, yielding a zero-order rate of 0.19 mg TVOC/kg dry soil/d – or 2.8 mg TVOC/L/d for the test soil.

If we apply benzene as a model component for the unidentified VOCs of the test, equilibrium calibrations for the test soil yield pore water concentrations of 1.3 to 8.8 mg/L, which is well within the concentration range where zero-order degradation of BTEX is expected (assuming a half saturation constant of 0.2 mg/L). Under these conditions, the zero-order estimate can be converted to a conservative pseudo first-order degradation rate of 0.32-2.2 d^{-1}, based on degradation in the pore water.

Comparing any of the above rate estimates to literature values of degradation rates (TVOC or BTEX), the obtained rate estimate is in the lower range of reported values. Considering that the test has been performed for unidentified VOCs at a (low) temperature of 7°C, and applying several conservative approaches in obtaining the rate estimate, the rate estimates obtained for the pilot test are considered realistic.

Microbial Diversity Analysis
Using a statistical Principal Component Analysis (PCA) the results of the DGGE microbial diversity analysis (using general primers) has been shown to be sufficiently sensitive to detect a difference between contaminated soil samples and non-contaminated reference samples collected at the same site. Hence, the results indicate that differences in contaminant loading/substrate availability yield detectable differences in the composition of the microbial community.

By using specific primers designed to target the gene coding for production of 6-Oxocyklohex-1-en-1-carbonyl-coenzym A hydrolase (6-OCH-CoA hydrolase), such genes were found in 4 out of 6 samples with varying degrees of expected contaminant presence. We expect in-situ degradation of diesel component vapors to take place (or to have taken place) in these areas of the site. No positive samples were detected among the reference samples.

Through the pilot test we have seen the potential for application of a method that – with the right functional target genes specific to the degradation of BTEX or other oil components – can be applied for qualitative evaluation of in-situ degradation of oil components in the unsaturated zone with JAGG 2.0 (level 2).

1 Indledning

1.1 Baggrund

I JAGG 1.5 inddrages den umættede zone kun i grundvandsmodulet og kun i det omfang, at kildegeometrien (areal og bredde) samt kildestyrkekoncentrationen skal karakteriseres. For risikovurderingen er det principielt ligegyldigt om der er 1 eller 50 meter fra bunden af forureningen i den umættede zone til det underliggende grundvand (transportafstanden fra kilde til grundvand), ligesom geologi, transportegenskaber og processer i de umættede aflejringer ikke har betydning for resultatet. Man kan sige, at den tidsmæssige dynamik, samt de processer, der måtte foregå under transporten fra kilde til grundvand, er trukket ud af risikovurderingen, hvilket medfører, at risikoen beregningsmæssigt overestimeres ift. den reelle risiko.

I JAGG 2.0 åbnes der op for at inddrage den umættede zone mere direkte i risikovurderingen, da der som en integreret del af beregningen fra en kilde, beliggende i den umættede zone, kan udføres en beregning af transporttiden/-dynamikken imens forureningen udvaskes/transporteres mod grundvandet /1/. For en kilde med oliekulbrinter kan der endvidere inddrages nedbrydning under transport igennem den umættede zone mod grundvandet. I JAGG 2.0 lægges der op til, at nedbrydning i den umættede zone kan inddrages på tre forskellige niveauer /1/, /2/ og /3/:

- Niveau 1: Der udføres en beregning af nedsivning til grundvandet uden at medtage nedbrydning. Beregningen forudsætter en geologisk model for lokaliteten.
- Niveau 2: Der udføres en beregning af nedsivning til grundvandet ved brug af en konservativ nedbrydningsrate baseret på litteraturdata. Dette gøres kun hvis: (a) forudsætningerne for nedbrydning vurderes at være til stede; og (b) O_2- og CO_2-koncentrationer i poreluften indikerer, at aerob nedbrydning finder sted.
- Niveau 3: Der fremskaffes lokalitetsspecifikke data til estimering af nedbrydningsrater i den umættede zone – f.eks. ved in-situ nedbrydningsforsøg.

På niveau 2 og 3 er det essentielt, at risikovurderingen følges op af en monitering til dokumentation/verificering af den inddragede nedbrydning. Herunder opstilles der massebalancer for kildestyrke, ilt, kvælstof og fosfor hvorved det sandsynliggøres, at der kan opretholdes balance imellem disse parametre over en tidshorisont, der svarer til kildens forventede levetid /2/.

For at imødegå behovet for at inddrage nedbrydningen i risikovurderinger for grundvandet (niveau 2 og 3), har Miljøstyrelsen igangsat et Teknologiprojekt med det formål, at belyse hvilke feltstrategier der kan benyttes til dokumentation af nedbrydning i den umættede zone; hhv. kvalitativt og kvantitativt /2/. Der er således udført et litteraturstudie af eksisterende/publicerede og nært tilgængelige dokumentationsstrategier. Kendetegnende for de identificerede strategier er, at de er forholdsvist arbejdskrævende og omkostningstunge (specielt på niveau 3). Dertil overvejes det, at igangsætte feltprojekter til afprøvning af anbefalingerne opstillet i /2/.

1.2 Praktiske erfaringer og udfordringer

På baggrund af tidligere erfaringer fra laboratorieundersøgelser og forurenede lokaliteter kan nævnes følgende vigtige pointer/udfordringer mht. vurdering af nedbrydning af oliestoffer i umættet jord:

a) Der kan stort set altid forventes en betydelig nedbrydning af oliekomponenter, herunder BTEX, under umættede forhold når der blot opretholdes aerobe forhold /4/. Hæmning kan dog forekomme under toksiske forhold og næringssaltbegrænsning /5/.
b) Nedbrydningen af BTEX-forbindelser vil gå hurtigt og massivt i gang efter tilførsel af kulbrinter (typisk indenfor 2-14 dage) /4/ og /6/.
c) Under dynamiske og rumligt variable forhold (når fysisk-kemiske og mikrobiologiske forhold varierer i tid og sted) kan det være vanskeligt at uddrage en eksakt nedbrydningsrate i den umættede zone /6/ og /7/. Sådanne dynamiske og rumligt variable forhold er desværre reglen frem for undtagelsen under in-situ forhold.

I forhold til praktiske risikovurderinger for oliestoffer er det endvidere kendetegnende, at nedbrydningsraten spiller en afgørende rolle for resultatet af risikovurderingen. Således vil selv en meget lav nedbrydningsrate i risikovurderingen ofte føre til et signifikant ændret risikobillede sammenlignet med en beregning, der ikke medtager nedbrydning.

Den helt store udfordring er derfor, at dokumentere/kvantificere den aktuelle nedbrydningsrate tilstrækkeligt overbevisende, så den kan inddrages i risikovurderinger i JAGG 2.0 regi – selvom det fysiske, kemiske og biologiske system er præget af store tidslige og rumlige variationer. Desuden skal en generelt anvendelig strategi gerne være lettilgængelig og ikke for omkostningstung.

1.3 Formål

Projektet har to overordnede formål:

1) At udvikle og afprøve en ny metode/strategi, kaldet Dual Point Degradation test (DPD-test) til kvalitativ og kvantitativ dokumentation af naturlig nedbrydning i den umættede zone (JAGG 2.0 niveau 2 og 3).

2) At afprøve om en analyse af den mikrobiologiske artsdiversitet kan anvendes til kvalitativ dokumentation for nedbrydning i den umættede zone (JAGG 2.0 niveau 2).

2 Metodebeskrivelser

2.1 Dual Point Degradation (DPD) testen

2.1.1 Princip

Dual Point Degradation testen (DPD-testen) er baseret på, at et modelstof for risikovurderingen (her benzen) nedblæses på gasform i ét punkt i den umættede zone og oppumpes i et nabopunkt (her i en afstand af cirka 20 cm).

På baggrund af en aerob og en anaerob test, samt en simpel analyse af gennembrudsgraden i opsugningspunktet for hver af de to tests, dokumenteres hvorvidt der sker in-situ nedbrydning og der dannes basis for at estimere en konservativ aerob in-situ nedbrydningsrate. Dataanalysen begrænser sig til at se på forskellen mellem koncentrationsniveauet i opsugningspunktet efter opnåelse af steady-state under hhv. det aerobe og anaerobe testforløb.

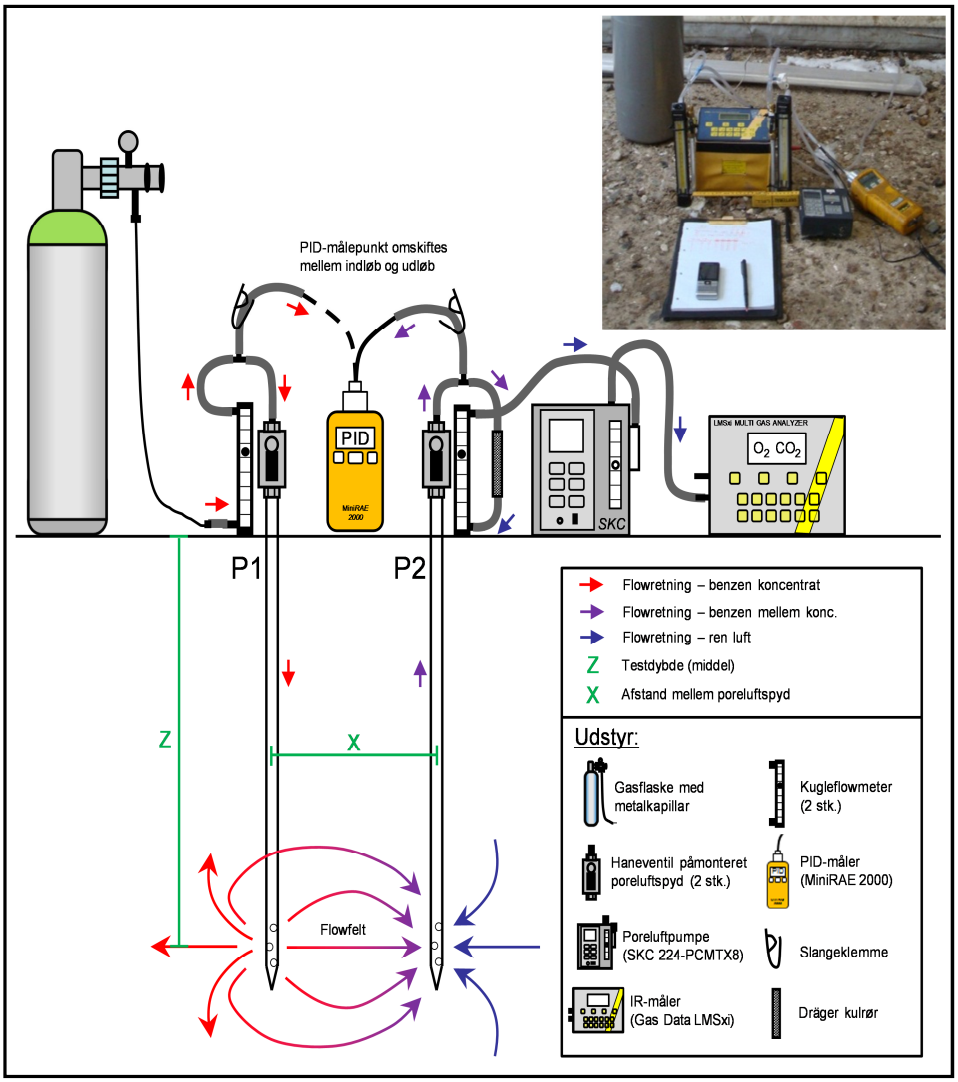
Testproceduren er fastlagt så den kan gennemføres med standard poreluftudstyr samt et par specialfremstillede gasblandinger. Tidspunktet for opnåelse af steady-state under testen estimeres ud fra feltmålinger (i pilottesten er der benyttet en PID-måler).

2.1.2 Feltudstyr

Under metodeudviklingen har der været fokus på at udnytte erfaringer fra den almindelige poreluftprøvetagningspraksis; både mht. til fremgangsmåde, udstyr og driftsbetingelser. Herved opnås, at den udførende sagsbehandler eller miljøtekniker på forhånd har en fingerspidsfornemmelse for opsætning af testopstillingen og potentielle usikkerheder, samt evt. for de lokalitetsspecifikke driftsbetingelser (modtryk, koncentrationsniveauer m.v.).

Følgende udstyrspakke anvendes, jf. figur 2.1:

- En aerob 20 L gasflaske med ca. 2.000 mg benzen/m^3 i 21 % O_2, med N_2 som grundgas (9 bar).
- En anaerob 20 L gasflaske med ca. 2.000 mg benzen/m^3 med N_2 som grundgas (39 bar).
- En trinløs reduktionsventil påsat en metalkapillar.
- To kugleflowmetre med intervallet 0,1 – 1,2 L/min.
- To poreluftspyd med påsat Ballofix haneventil.
- PID-måler (MiniRAE 2000) – bruges til feltvurdering af steady-state.
- En SKC pumpe (224-PCMTX8 Deluxe).
- En IR-måler (Gas Data LMSxi).
- Diverse slanger, T-stykker, klemventiler og Dräger kulrør.



Figur 2.1: Foto og skematisk tegning af feltopstillingen. P1 er injektionspunktet og P2 er opsugningspunktet. Pilottesten er udført i dybden 100 cm (Z) og med 20 cm afstand mellem poreluftspyddene (X).

2.1.3 Databehandling

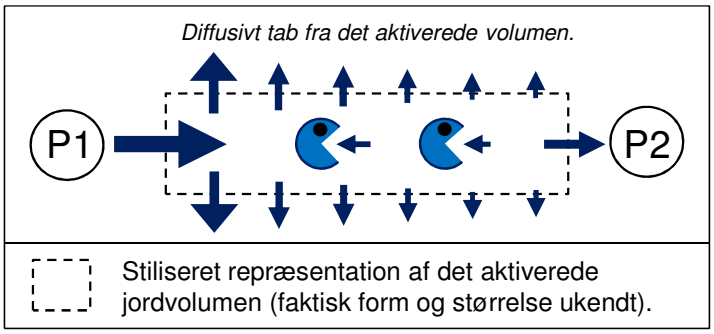
Det kan være en omfattende og omkostningskrævende proces at estimere nøjagtige nedbrydningsrater under de dynamiske og rumligt varierende forhold, som ofte er gældende i felten. Derfor er det hensigtsmæssigt at bestemmelse af nedbrydningsrater foretages under stationære forhold (dvs. steady-state).

2.1.3.1 Aerob test

Først gennemføres et aerobt testforløb med et konstant flow, der er det samme i P1 og P2 (i pilotforsøget 1 L/min), samt med en konstant koncentration af det valgte modelstof i indløbet (i pilotforsøget ca. 2.000 mg/m^3).

Når udløbskoncentrationen for denne test har nået et konstant niveau er der ligevægt mellem det massinput, systemet påføres og processerne i jordmatricen ved det resulterende koncentrationsniveau. Der har indstillet sig en ligevægt mellem koncentrationen i poreluften, porevandet (opløsning) og på jordpartiklerne (adsorption). Derudover er der opnået ligevægt imellem den resulterende koncentration i gasfasen og det diffusive tab til den omkringliggende jordmatrice. Endelig vil udløbskoncentrationen afspejle den in-situ nedbrydning, der foregår i matricen under de betingelser der er (påført).

Forskellen imellem det masseinput jordmatricen tilføres i injektionspunktet, P1, og den masse, der trækkes ud i P2 (mg/dag) er således lig med den masse som forsvinder ud af systemet via gasdiffusion og nedbrydning. Dette er illustreret som summen af massestrømspilene ud af boksen, samt det der omsættes af mikroorganismerne i figur 2.2.



Figur 2.2: For den aerobe test kan tabet til diffusion og nedbrydning estimeres som forskellen mellem massetilførsel i P1 og masseudtræk ved P2 (ved steady-state).

Massetabet under den aerobe testdel ved steady-state estimeres som:

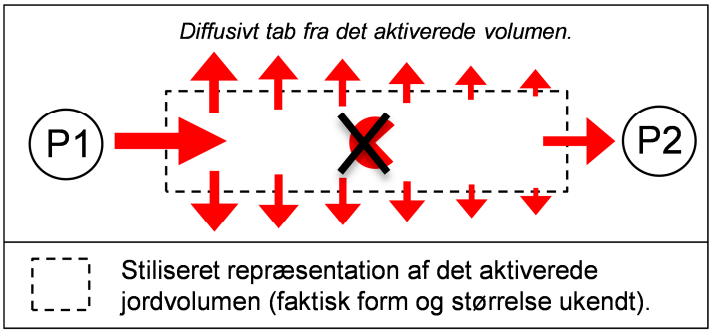
$$T_{aerob} = Q \cdot \left(C_{1,aerob} - C_{2,aerob}\right) \qquad (1)$$

Hvor T_{aerob} [mg/dag] er det aerobe massetab af modelstoffet til diffusion og nedbrydning, Q [m^3/dag] er flowet igennem P1 og P2 (i pilottesten 1 L/min · 60 min/time · 24 timer/dag / 1.000 L/m^3 = 1,44 m^3/dag), $C_{1,aerob}$ [mg/m^3] er koncentrationen i P1 under den aerobe testdel (i pilottesten 2.000 mg/m^3) og $C_{2,aerob}$ [mg/m^3] er koncentrationen i P2 når der er opnået steady-state (måles ved akkrediteret kemisk analyse).

2.1.3.2 Anaerob test

Efterfølgende gennemføres en anaerob test med samme konstante flow som under den aerobe test (Q) og med samme konstante koncentration af modelstoffet i P1 (1 L/min i både P1 og P2 samt ca. 2.000 mg/m^3 i P1).

Når udløbskoncentrationen for denne test har nået et konstant niveau er der igen ligevægt mellem det massinput, der påføres systemet og processerne i jordmatricen ved det resulterende koncentrationsniveau. Forskellen mellem det masseinput jordmatricen tilføres i injektionspunktet, P1 og den masse, der trækkes ud i P2 (mg/dag) er således lig med den masse som forsvinder ud af systemet via diffusion. Nedbrydningen sættes lig nul, da der altovervejende er tale om anaerobe forhold i jordmatricen. Det diffusive massetab kan illustreres som summen af massestrømspilene ud af boksen i figur 2.3.



Figur 2.3: For den anaerobe test kan tabet til diffusion estimeres som forskellen mellem massetilførsel i P1 og masseudtræk ved P2 (ved steady-state).

Massetabet under den anaerobe testdel ved steady-state estimeres som:

$$T_{anaerob} = Q \cdot \left(C_{1,anaerob} - C_{2,anaerob}\right) \quad (2)$$

Hvor $T_{anaerob}$ [mg/dag] er det anaerobe massetab af modelstoffet til diffusion, Q [m^3/dag] er flowet igennem P1 og P2 (i pilottesten 1 L/min · 60 min/time · 24 timer/dag / 1.000 L/m^3 = 1,44 m^3/dag), $C_{1,anaerob}$ [mg/m^3] er koncentrationen i P1 under den anaerobe testdel (i pilottesten 2.000 mg/m^3) og $C_{2,anaerob}$ [mg/m^3] er koncentrationen i P2 når der er opnået steady-state (måles ved akkrediteret kemisk analyse).

2.1.3.3 Estimering af nedbrydningsraten

Den aerobe nedbrydningsrate for den del af jordmatricen, som er inddraget i testen, estimeres efterfølgende som det aerobe massetab fratrukket det anaerobe massetab. Bemærk at ligning 3 kun gælder når koncentrationen i P1 er konstant og den samme i både den aerobe og den anaerobe test ($C_{1,aerob}$ = $C_{1,anaerob}$ og i pilottesten = 2.000 mg/m^3), og når flowet i P1 og P2 er konstant og det samme i både den aerobe og den anaerobe test (i pilottesten Q = 1 L/min = 1,44 m^3/dag).

$$T_{nedbrydning} = T_{aerob} - T_{anaerob} = Q \cdot \left(C_{2,anaerob} - C_{2,aerob}\right) = Q \cdot \Delta C_2 \quad (3)$$

Hvor $T_{nedbrydning}$ [mg/dag] er estimatet på det aerobe massetab af modelstoffet til nedbrydning, Q [m^3/dag] er det samme konstante flow i P1 og P2 under såvel den aerobe som den anaerobe test (Q = 1,44 m^3/dag), mens $C_{2,aerob}$ og $C_{2,anaerob}$ [mg/m^3] er koncentrationen i P2 for hhv. den aerobe og den anaerobe test når der er opnået steady-state.

På dette tidspunktet har estimatet på nedbrydningsraten en atypisk enhed (mg/dag) idet 0. ordensrater typisk angives i enheden (mg/kg TS/dag) og 1. ordensrater typisk angives med enheden (dag^{-1}). Hvis vi kan opnå et estimat på nedbrydningsraten, der har en af disse enheder, ville det være muligt, at sammenligne den konkrete værdi med litteraturværdier.

Et estimat på en 0. ordensrate (mg/kg TS/dag) kan opnås ved at estimere den masse af jord (kg TS), der er aktiveret under testen; eksempelvis som det er gjort for pilottesten, jf. afsnit 4.2.3.2.

2.2 Diversitetsundersøgelse

2.2.1 Princip

Bestemmelse af artsdiversiteten/sammensætningen af den mikrobielle population for jordprøver kan udføres via en procedure bestående af fire trin, som beskrives i det følgende:

1. Ekstraktion af biomasse-DNA fra jordprøver.
2. Opformering af DNA ved PCR.
3. DGGE-fingerprinting.
4. Databehandling.

2.2.1.1 Ekstraktion af biomasse-DNA fra jordprøver

Til projektet er der indsamlet jordprøver bestående af ca. 50 g jord forskellige steder på/omkring testlokaliteten, jf. afsnit 3.

Det første skridt i den anvendte procedure er, at ekstrahere DNA fra de bakterier der er i prøvematerialet. Dette gøres, kort fortalt ved en kombination af en mekanisk og en kemisk homogenisering, hvor total genomisk DNA opsamles på en silika membran hvor det vaskes og elueres igen, i henhold til leverandørens anvisninger (PowerSoil™ DNA Isolation Kit; MO-BIO).

2.2.1.2 Opformering af DNA ved PCR

Efter DNA-ekstraktion foretages en opformering af f.eks. det gen, der koder for bakteriernes ribosomale DNA ved "Polymerase Chain Reaction" (PCR) med *generelle primere*, som rammer alle bakterier /8/. Dermed bliver det muligt efterfølgende, at lave en analyse, hvor man undersøger hvilke bakteriearte, der var til stede i det oprindelige prøvemateriale ved opslag i et klonbibliotek (database over bakteriers arvemasse).

Alternativt er det muligt, i forbindelse med PCR-trinnet af proceduren, at anvende *specifikke primere*, som er designet til at opformere DNA fra et specifikt gen. Dette gen kunne vælges blandt de gener der koder for enzymer, som er kritiske for at en given nedbrydningsproces kan forløbe. Også i dette tilfælde er det muligt, at lave opslag i et klonbibliotek, men nu blot ud fra den del af bakterierne, der besidder arvemateriale for det pågældende enzym.

Til at analysere for den mikrobielle diversitet anvendes overordnet et universal primersæt (341F og 518R, jf. /9/), som rammer stort set alle kendte bakterier, nemlig V3 regionen i det ribosomale 16S rRNA gen, som er til stede i alle bakterier.

Til detektion af aromatnedbrydere har vi endvidere testet to primersæt, der er designet til at ramme gener der koder for ringhydrolyserende dioxygenaser: (i) FRT5A og FRT3B, der er designet til at ramme polyaromatiske hydrocarbon (PAH) dioxygenase kodende gener /10/, samt (ii) SP9/ASP1 primersættet, der er designet til at ramme generne der koder for 6-Oxocyklohex-1-en-1-carbonyl-coenzym A hydrolase (6-OCH-CoA hydrolase), der indgår som en generel del af reaktionsvejen for fakultative og anaerobe aromatnedbrydere /11/. Det bemærkes, at dieselolie typisk indeholder mellem 2 og 5 % PAH'er /12/ og /13/ og under 1 % BTEX /13/. De testede primere fremgår oversigtsmæssigt af tabel 2.1:

Navn	Målgruppe	Sekvens	Ref.
341F	Universel V3 region af 16S rRNA genet	CCT ACG GGA GGC AGC AG	/9/
518R	Universel V3 region af 16S rRNA genet	ATT ACC GCG GCT GCT GG	/9/
FRT5A	PAH dioxygenase-gener	TYR ARG CYA ACT GGA A	/10/
FRT3B	PAH dioxygenase-gener	CAT GTC TTT TTC KAC VAT GGC	/10/
SP9	Generel 6-OCH-CoA hydrolase gener	CAG TAC AAY TCC TAC ACV ACB G	/11/
ASP1	Generel 6-OCH-CoA hydrolase gener	CMA TGC CGA TYT CCT GRC	/11/
GC-hale	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G		/9/

Tabel 2.1. Oversigt over de anvendte PCR-primere.

2.2.1.3 DGGE-fingerprinting

Efterfølgende er der benyttet en procedure der hedder Denaturerende Gradient Gel Elektroforese (DGGE), som er baseret på analyse af tilstedeværende bakteriers (forskelle i) DNA. En detaljeret beskrivelse af proceduren bag

DGGE-fingerprinting, som den er anvendt i nærværende rapport, fremgår af /14/.

Ved DGGE-fingerprinting benyttes det forhold, at DNA-molekyler er elektrisk ladede, hvorfor de kan bringes til at vandre igennem en gel der påføres en spændingsforskel (elektroforese). I den gel der anvendes, er der indbygget en stigende koncentration/en gradient af carbamid (urinstof), der kan få DNA til at denaturere (blive to-delt). Når DNA er denatureret bevæger det sig ikke længere i gelen. Da forskellige DNA-sekvenser har forskellige tolerancer for carbamid, vil DNA-sekvenserne fra forskellige organismer migrere forskelligt afstande i gelen inden DNA denaturerer, og når DNA er denatureret stopper vandringen.

Prøven med PCR-produktet påsættes gelen og under den efterfølgende elektroforese vil genkopier med forskellig basesekvens denatureres (splittes i to) på forskellige positioner i gelen, hvorved der opstår karakteristiske DNA-bånd. Et bånd er således en udfældning af DNA fra én art af bakterier fra den oprindelige jordprøve, der samtidigt svarer til den anvendte PCR-primer.

Forskelle i den bakterielle flora kan efterfølgende identificeres ved belysning med UV-lys, hvorved der dannes forskellige synlige bånd på DGGE-gelen. Typisk kommer der bånd fra den del af biomassen som udgør mindst 10^3-10^4 CFU/g jord eller ca. 0,5-1 % af den samlede biomasse /15/.

Ved at sammenligne bånd på gelen fra forskellige jordprøver bliver det således muligt, at visualisere hvilke bånd - og dermed hvilke bakteriearter - der er ens eller adskiller forskellige prøver. Efterfølgende kan båndende skæres ud af gelen og sekventeres med henblik på at artsbestemme de mest dominerende bakterier, der har givet anledning til et specifikt bånd. Typisk vil man således identificere organismerne bag bånd, der afviger fra prøve til prøve – f.eks. ved en sammenligning af biomassen fra uforurenede og forurenede jordprøver.

2.2.2 Databehandling

2.2.2.1 Digital billedbehandling
Billeder taget af DGGE-gelerne kan analyseres ved digital billedanalyse af de forskellige bånds placering på gelen og af båndenes intensiteter. Herved opnås en semikvantitativ bestemmelse af, hvor mange bakterier af hver art (i de enkelte bånd), der forekommer i hver jordprøve.

Billedanalysen er i dette projekt udført ved anvendelse af en macro i programmet ImageJ, som er udviklet til formålet. Kort fortalt analyserer macroen automatisk pixelintensiteten i en defineret række af pixel omtrentligt svarende til bredden af et bånd. Dette gøres for alle pixels ned igennem gelen og det er dermed muligt at sammenligne intensiteten for hvert bånd i hver prøve med den tilsvarende position i de resterende prøver.

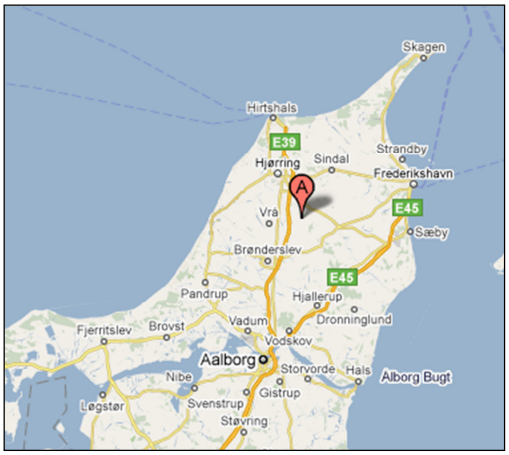
2.2.2.2 Statistisk analyse ved Principal Component Analysis
Resultaterne er efterfølgende behandlet ved Principal Component Analysis (PCA) i Unscrambler®. PCA er et statistisk redskab, som anvendes til analyse af data med mange variabler, i dette tilfælde bånd på gelen fra hver jordprøve. Ved PCA-analysen findes grupperinger i dataene dvs. de prøver hvor DGGE-profilerne (dvs. båndmønstrene) udviser den højeste korrelation.

2.2.2.3 Sekventering/artsbestemmelse

Hvert af de udskårne bånd er oprenset, PCR-amplificeret, sekventeret og fylogenetisk identificeret. Dette indebærer en alignment og sammenligning med nærmeste slægtninge vha. Silva-ARB databasen (http://www.arb-silva.de/) og efterfølgende fylogenetisk analyse i programmet MEGA 5.

3 Lokalitet for pilotforsøg

Testlokaliteten har fra før 1946 og til i dag været anvendt til vognmandsforretning med oplag af dieselolie. Dette har medført jord- og grundvandsforurening ved en utæt nedgravet tank og der er foretaget en afgravning af størstedelen af jordforureningen. Der er dog efterladt en mindre restforurening med dieselolie i udgravningens kant under offentlig vej. Lokaliteten er beliggende i Hjørring Kommune (jf. figur 3.1).



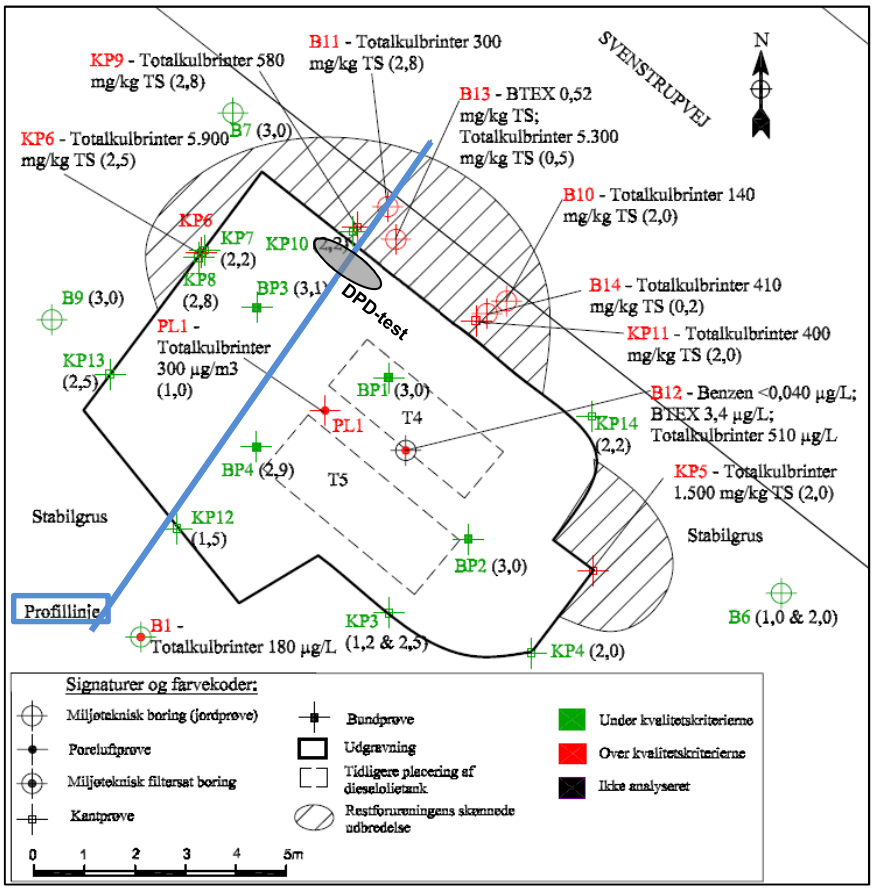
Figur 3.1: Placering af testlokaliteten (A).

Restforureningen er konstateret fra 0,5 – 2,8 meter under terræn (m.u.t.). og er karakteriseret ved jordprøver med totalindhold af kulbrinter på mellem 580 og 5.300 mg/kg TS, mens koncentrationen af BTEX er maksimalt 0,5 mg/kg TS. Restforureningen er beliggende i fyldjord, bestående af muldet sand. Fyldlaget har en mægtighed på op til ca. 1,7 meter. Grundvandsspejlet er konstateret omkring 2,6 m.u.t. og grundvandets strømningsretning er bestemt som værende sydøstlig.

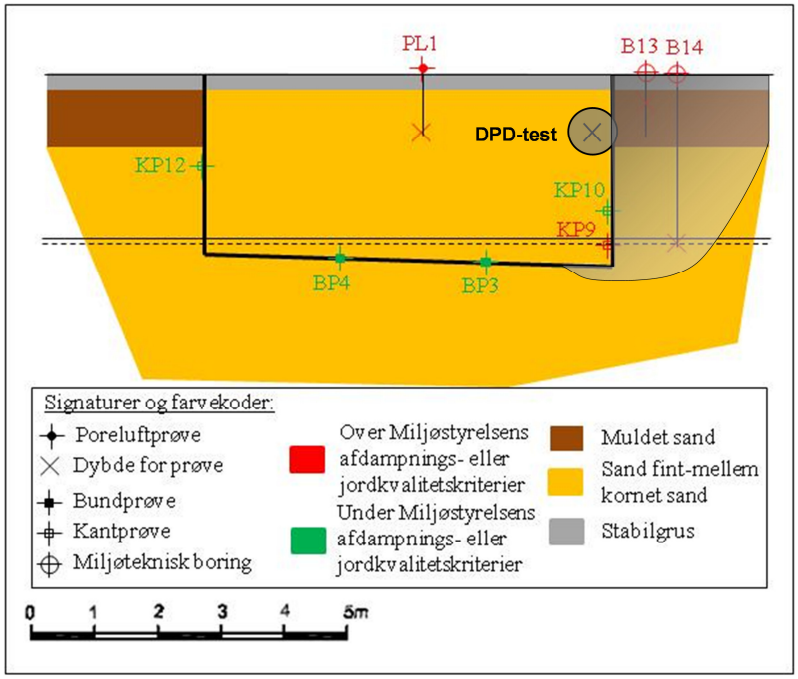
Området for gennemførelse af DPD pilottesten, efter genopfyldning af udgravningen med rent fyldsand, er vist i figur 3.2.

Figur 3.2: Område for gennemførelse af DPD pilottesten i udgravning efter genopfyldning med rent fyldsand.

Restforureningens beliggenhed fremgår af oversigtstegningen i figur 3.3, der også viser udtagningspunkter for jord-, grundvands- og poreluftprøver samt området for udførelsen af DPD pilottesten. I figur 3.4 ses et tværsnit langs profillinjen vist i figur 3.3.



Figur 3.3: Oversigt over testlokalitet. Tal i parentes angiver dybden (m.u.t.) hvor prøven er udtaget. T4 og T5 angiver placeringen af to tidligere nedgravede tanke til dieselolie. Testområdet for DPD-testen er ligeledes markeret (jf. figur 3.3). Profillinjen angiver placering af tværsnittet vist i figur 3.4.

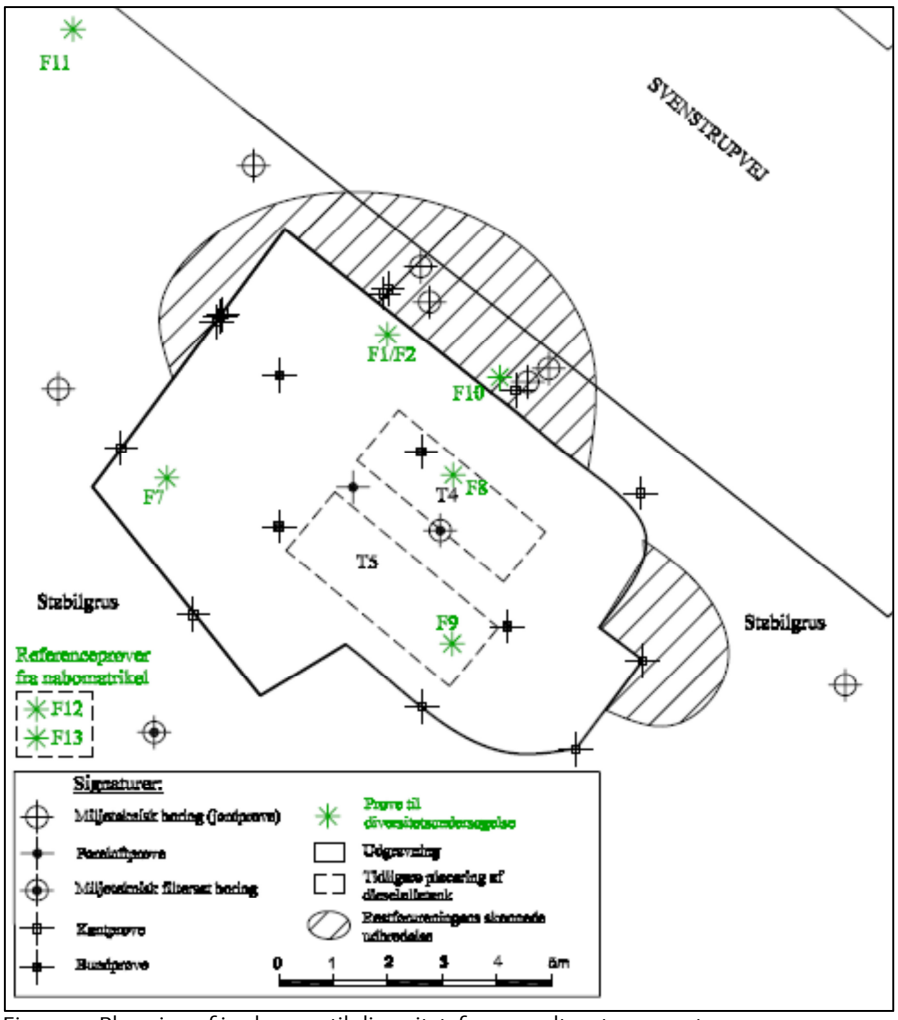


Figur 3.4: Tværsnit igennem graveområde, vist i figur 3.3.

Diversitetsundersøgelsen er foretaget på ni jordprøver (benævnt F1-F2 og F7-F13), som er udtaget med håndbor i en meters dybe på og omkring lokaliteten. Prøvernes placering er udvalgt således:

- F1 og F2 er udtaget i fyldsand i midten af DPD-testområdet hhv. før og efter DPD-test.
- F7-F9 er udtaget i sandfyld i områder, hvor der muligvis er forskellige grader af påvirkning fra restforureningen; evt. via påvirkning fra lettere forurenet grundvand.
- F10 er udtaget i intakte aflejringer i restforureningen.
- F11 er udtaget i intakte aflejringer udenfor restforureningen (referenceprøve).
- F12 og F13 er udtaget fra området, hvor tilkørt rent fyldsand er opgravet på nabomatriklen (referenceprøver).

Prøvernes placering på lokaliteten fremgår oversigtsmæssigt af figur 3.5.



Figur 3.5: Placering af jordprøver til diversitetsforsøg, udtaget 1,0 m.u.t.

4 Pilotforsøg: DPD-testen

4.1 Forsøgsbetingelser

4.1.1 Jordtype og temperatur

Pilottesten er gennemført den 3. december 2010 i en dybde på 1,0 m.u.t. i sandfyld ca. 15 cm fra gravefronten i den tidligere udgravning og med en afstand på 20 cm imellem poreluftspyddene (P1 og P2).

Der er udført en sigteanalyse, glødetabebestemmelse og vandindholdsbestemmelse på forsøgsjorden/fyldsandet i umiddelbar nærhed af området for DPD-testen. Der er tale om en sandjord med ca. 4 % silt, 43 % finsand, 40 % mellemkornet sand, 8 % grovsand og 5 % grus. Fraktionen af organisk kulstof (f_{oc}) er, på baggrund af glødetabsanalyser, estimeret til 0,42 % (f_{oc}= 0,0042), og vandindholdet er bestemt til 6,9 % (w/w) svarende til et volumetrisk vandindhold (V_V) på ca. 0,10 L vand/L jord (ved JAGG-ρ_b = 1,46 kg TS/L jord).

På test-tidspunktet var der ca. 17 cm frost i jorden og en jordtemperatur i 1 meters dybde på ca. 7 °C (målt med PID-måler). Erfaringsmæssigt forhindrer en lav temperatur (<5 °C) ikke nødvendigvis en effektiv nedbrydning i den umættede zone /16/. Forskellen på nedbrydningsrater bestemt ved f.eks. 7 og 17 °C (ofte benævnt Q_{10}) vil dog ofte være i størrelsesordenen en faktor 2-3.

4.1.2 Afvigelser fra testdesign

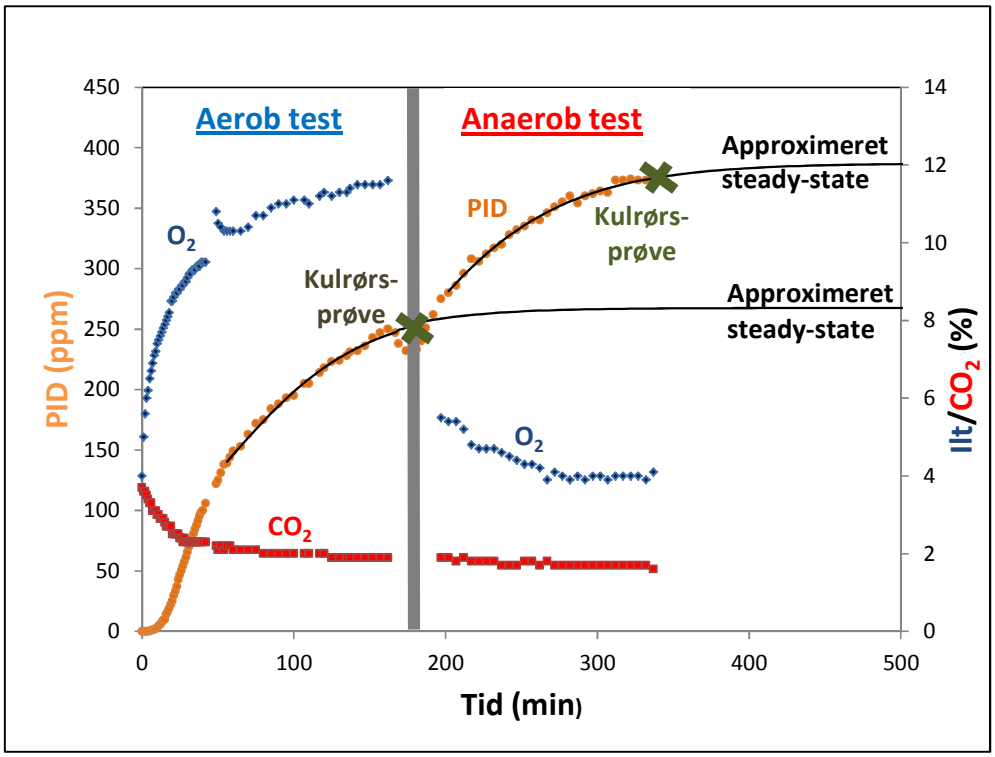
Kulrørsprøver af de indkøbte standardgasser, som var bestilt med 2.000 mg benzen/m^3, har vist, at kun hhv. 225 og 255 mg/m^3 af de indkøbte gasser (aerob og anaerob) er benzen, mens resten består af andre (uidentificerede) kulbrinter. En efterfølgende kontakt til gasleverandøren (KVG) samt en efterbestilt GC-MS screening af gasprøver fra hhv. den aerobe og anaerobe gas har ikke givet nogen entydig afklaring på hvilke andre kulbrinter (udover benzen) der befinder sig i de indkøbte gasblandinger. Det vurderes, at der er tale om kulbrinter med et kogepunktinterval i området 50-70 °C.

Pilottesten er således gennemført med ca. 2.000 mg TVOC/m^3 i stedet for med ca. 2.000 mg benzen/ m^3 som forudsat/planlagt; vel at mærke med uidentificerede TVOC med kogepunktsinterval i området 50-70 °C.

4.2 Resultater

4.2.1 Tolkning af rådata

Resultater fra den udførte DPD-pilottest er vist i figur 4.1. Under forsøget er der foretaget kontinuerte målinger af ilt, kuldioxid og PID i den opsugede luft fra P2. På baggrund af PID-målingerne er der udtaget kulrørsprøver til akkrediteret analyse for det absolutte indhold af kulbrinter i den oppumpede luft fra P2, som angivet på figur 4.1.



Figur 4.1: Resultater målt i P2: O2, CO2 og PID. Omkring 50 min blev Q ved et uheld momentant opjusteret til 1,2 L/min, og der ses en stigning af ilt i udløbet (P2). Det aerobe testforløb var ca. 170 min og det anaerobe testforløb var ca. 160 min.

Det bemærkes, at PID-målinger ikke kan benyttes direkte til estimering af TVOC-koncentrationen da ilt hæmmer PID-signalet. Således kan et højt PID-udslag under den anaerobe testdel (lav O_2-koncentration) være udtryk for en lavere TVOC-koncentration end et tilsvarende højere PID-udslag under den aerobe testdel. PID-niveauet er således udelukkende anvendt til at estimere tidspunktet for steady-state.

Det ses, at der til tiden nul er tegn på mikrobiologisk aktivitet i testområdet, idet indholdene af O_2 og CO_2 begge er ca. 4 %.

Når den aerobe test igangsættes (TVOC i atm. luft nedblæses i P1) ses det, at O_2-koncentrationen i P2 stiger, mens CO_2-koncentrationen falder (O_2 erstatter CO_2). Sideløbende stiger PID-udslaget og bliver relativt konstant. Herefter opsamles 10 L af den oppumpede poreluft på kulrør til akkrediteret kulbrinte-analyse ($C_{2,aerob}$).

Ved den anaerobe testdel (TVOC i kvælstof nedblæses i P1) falder O_2 og CO_2 i P2. Imens stiger PID-udslaget til et nyt niveau, hvor der er ligevægt imellem den mængde TVOC der tilføres, diffunderer ud af testvoluminet og suges op i P2. Der opsamles 10 L af den oppumpede poreluft på kulrør til akkrediteret kulbrinteanalyse ($C_{2,anaerob}$).

4.2.2 Usikkerheder omkring opnåelse af steady-state

Som det fremgår af figur 4.1 er den aerobe testdel ikke kørt helt til steady-state, da gasflasken forinden løb tør (efter ca. 180 min). Efterfølgende er steady-state PID-niveauet approximeret til at være ca. 8 % højere end på tidspunktet for udtagning af kulrørsprøven (se figur 4.1). Ved databehandlingen i afsnit 4.5 er det akkrediterede kulbrinteniveau for det aerobe testforløb således opjusteret med 8 %.

Tilsvarende blev den anaerobe testdel i felten vurderet at have nået steady-state, efter der var observeret konstant PID i P2 over en periode på ca. 30 min. Efterfølgende er det approksimeret, at steady-state PID-niveauet var omkring 4 % højere end ved udtagning af kulrørsprøven, jf. figur 4.1. Ved databehandlingen i afsnit 4.5 er det akkrediterede kulbrinteniveau for den anaerobe testdel således opjusteret med 4 %.

På baggrund af de approksimerede niveauer og tidspunkter for steady-state vurderes det samlede testforløb under de givne testbetingelser, at skulle have løbet over 10 timer (300 min for hver testdel).

Ved gennemførelse af aktuelle tests er det naturligvis essentielt, at hver testdel køres til komplet steady-state før der udføres akkrediteret analyse af den oppumpede poreluft, jf. diskussionen af forudsætningerne for databehandlingen i afsnit 2.1.3.

4.2.3 Estimering af nedbrydningsraten

4.2.3.1 Rateestimat (0. orden) med enheden mg TVOC/dag
På baggrund af de approksimerede steady-state PID-niveauer (+8 % for den aerobe test og +4 % for den anaerobe test) og TVOC-indholdet i de udtagne kulrørsprøver (hhv. 240 og 350 mg TVOC/m^3 for den aerobe og anaerobe test) estimeres $C_{2,aerob}$ og $C_{2,anaerob}$ til:

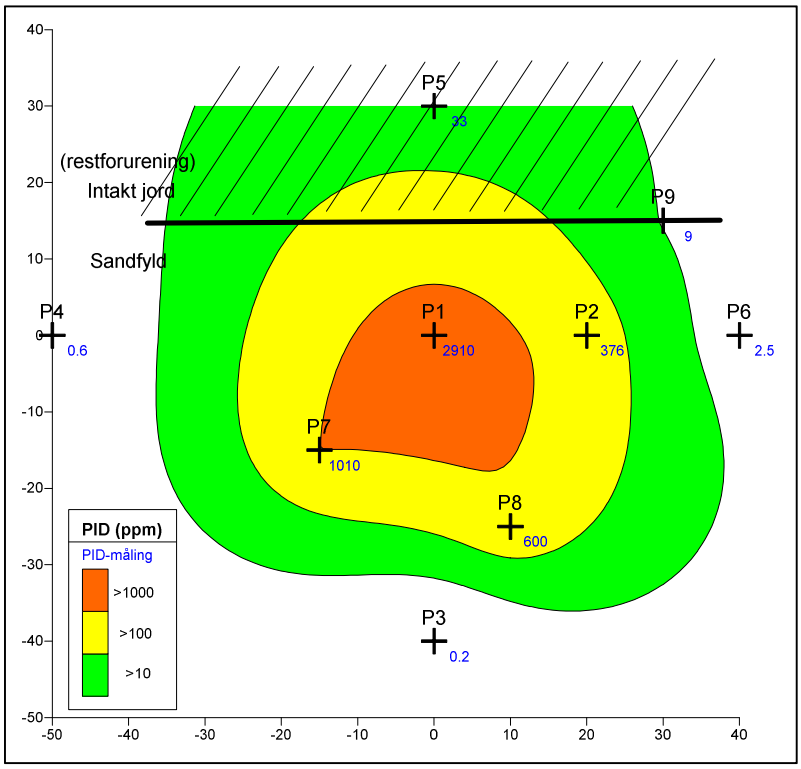
$$C_{2,aerob} = 240 \cdot 1{,}08 = 259 \text{ mg/m}^3$$
$$C_{2,anaerob} = 350 \cdot 1{,}04 = 364 \text{ mg/m}^3$$

Under de givne betingelser ($C_{1,aerob} = C_{1,anaerob}$ = 2.000 mg TVOC/m^3 og Q = 1,44 m^3/dag) kan det aerobe massetab ved nedbrydning estimeres vha. ligning 3 fra afsnit 2.1.3:

$$T_{nedbrydning} = T_{aerob} - T_{anaerob} = Q \cdot \left(C_{2,anaerob} - C_{2,aerob}\right)$$
$$T_{nedbrydning} = 2.507 - 2.356 = 1{,}44 \cdot \left(364 - 259\right)$$
$$T_{nedbrydning} = \underline{151 \text{ mg TVOC/dag}}$$

Som det fremgår af ovenstående kan der, under de givne betingelser og forudsætninger, estimeres en in-situ aerob 0. ordens-nedbrydningsrate til ca. 150 mg TVOC/dag.

4.2.3.2 Rateestimat (0. orden) med enheden mg TVOC/kg TS/dag
For at omregne ovenstående 0. ordensrate til enheden mg TVOC/kg TS/dag, hvor der er mulighed for at sammenligne med litteraturværdier, er der efter gennemførelse af pilottesten foretaget en vurdering af influensradius og det jordvolumen, der har været berørt af testen. Vurderingen blev foretaget på baggrund af PID-målinger i forskellige afstande fra P1 og P2 i 1 meters dybde. Det "aktiverede" jordvolumen blev defineret, som der hvor PID-udslaget var højere end 10 ppm, svarende til <0,4 % af det maksimale PID-niveau (2910 ppm i P1). Resultaterne fremgår af figur 4.2.



Figur 4.2: Orienterende PID-afgrænsning af det aktiverede jordvolumen umiddelbart efter testen i en dybde på 1,0 m.u.t. Afgrænsningen er sat ved 10 ppm.

På baggrund af resultaterne i figur 4.2 antages det aktiverede jordvolumen at være i størrelsesordenen 0,8 m · 0,8 m · 0,8 m (altså med en "radius fra injektionspunktet P1 på ca. 0,4 meter). Det svarer til, at ca. 0,5 m^3 jord er inddraget i testen.

Om noget vurderes ovenstående jordvolumen at være overestimeret, da der forventes en PID-afsmitning pga. diffusivt tab fra det reelle aktiverede jordvolumen, jf. figur 2.2 og 2.3. En overestimering af det aktiverede jordvolumen vil lede til en konservativ (dvs. underestimeret) nedbrydningsrate.

Antages jordens volumenvægt at være 1.600 kg TS/m^3 kan det anslås, at ca. 800 kg TS har været aktiveret under testen. På baggrund af en nedbrydningshastighed svarende til 150 mg TVOC/dag i 800 kg TS kan 0. ordensraten estimeres til 0,19 mg TVOC/kg TS/dag (målt ved en temperatur på 7 °C). En høj antaget volumenvægt vil, alt andet lige, lede til et konservativt estimat på nedbrydningsraten.

4.2.3.3 Rateestimat (0. orden) med enheden mg TVOC/L porevand/dag

Da den biologiske nedbrydning i mange sammenhænge antages at være relateret til porevandsfasen og –koncentrationen, kan det være relevant, at estimere en nedbrydningsrate, der relaterer sig til denne fase. Dette kan lade sig gøre hvis man har kendskab til jordens volumenvægt (ρ_b) og volumetriske vandindhold (V_V).

$$k_{0,porevand} = \frac{k_{0,TS} \cdot \rho_b}{V_V} \qquad (4)$$

Hvor $k_{0,porevand}$ [mg TVOC/L porevand/d] er 0. ordensraten, relateret til porevandet, og $k_{0,TS}$ [mg TVOC/kg TS/d] er relateret til jordens tørstofindhold.

I dette tilfælde vil et konservativt estimat på nedbrydningsraten (i enheden mg/L/d) kunne opnås ved – om noget – at underestimere volumenvægten og overestimere vandindholdet. Dette er værd at huske på, hvis man ikke har lokalitetsspecifikke in-situ værdier til rådighed, eller hvis der er rumlige variationer på lokaliteten/i testområdet, som ellers ville være besværlige at håndtere.

For den aktuelle jordtype (med et vandindhold på 0,10 L/L og en skønnet realistisk-konservativ volumenvægt på 1,46 kg/L, jf. afsnit 4.1.1) kan den estimerede nedbrydningsrate på 0,19 mg TVOC/kg TS/d, omregnes vha. ligning 4:

$$k_{0,porevand} = \frac{0{,}19 \cdot 1{,}46}{0{,}10} = \underline{2{,}8 \text{ mg TVOC/L porevand/d}}$$

Altså kan der estimeres en realistisk-konservativ 0. ordensrate, relateret til porevandet, på 2,8 mg TVOC/L/dag (0,12 mg TVOC/L/time).

4.2.3.4 Rateestimat (1. orden) med enheden dag^{-1}
Ud fra 0. ordens rateestimatet i afsnit 4.2.3.3 kan der opnås et 1. ordens rateestimat, relateret til porevandsfasen, ved at omrokere ligningen for 1. ordens kinetik:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{0,porevand} = -k_1 \cdot C$$
$$k_1 = \frac{k_{0,porevand}}{C} \qquad (5)$$

Hvor k_1 [dag^{-1}] er 1. ordensraten, relateret til porevand, og C [mg/L]er koncentrationen af forureningsstoffet i jordens porevand.

For at benytte ligning 5 er det nødvendigt, at finde koncentrationen i porevandet under DPD-pilottesten. Koncentrationerne i gasfasen var på 2.000 mg/m^3 i P1 og ca. 300 mg/m^3 i P2. Hvis vi, for eksemplets skyld, antager at der havde været tale om benzen kan de tilsvarende porevandskoncentrationer estimeres i JAGG-modellens fugacitetsmodul. I det aktuelle tilfælde estimeres poreluftkoncentrationerne på hhv. 2.000 og 300 mg/m^3, at svare til porevandskoncentrationer på hhv. 8,8 og 1,3 mg/L porevand.

Ved at indsætte ovenstående porevandskoncentrationer i ligning 5 kan der således opnås 1. ordens rateestimater på 0,32-2,2 d^{-1} (svarende til 0,013-0,092 h^{-1}), baseret på nedbrydning i porevandet.

4.2.3.5 Sammenligning med litteraturværdier
Da ovenstående rateestimater er opnået for uidentificerede lavtkogende kulbrinter er det naturligvis svært at vide hvad DPD-rateestimatet fra pilottesten med rette kan sammenlignes med. Nedenfor er det alligevel forsøgt at sammenligne raterne fra pilotforsøget med litteraturværdier fra benzen, BTEX og benzindampe (TVOC).

Da nogle af litteraturværdierne er opnået ved højere temperaturer end DPD-estimaterne ovenfor, er der for at kunne foretage en meningsfyldt sammenligning, foretaget en temperaturkorrektion vha. nedenstående Arrhenius-udtryk /17/:

$$\frac{k_1}{k_2} = \alpha^{T_1 - T_2} \qquad (6)$$

I ligning 6 sættes α typisk til 1,07, svarende til en Q_{10} på ca. 2. Erfaringer med nedbrydning af benzen i danske jorde indikerer, at en α i denne størrelsesorden også er gældende for benzen-nedbrydning under danske forhold /18/.

I et større dansk studie af nedbrydning af benzin-TVOC og benzen i forskellige jordtyper på samme lokalitet /19/ er der fundet in-situ 0. ordensrater for TVOC (omregnet til 7 °C) i størrelsesordenen 0,7-0,8 mg/kg TS/d, jf. tabel 4.1, hvilket er ca. 4 gange højere, end DPD-raten på 0,19 mg/kg TS/d, jf. afsnit 4.2.3.2.

Finsand		**25°C**	**10°C**	**7°C**
In-situ respirationstest	Benzin-TVOC	-	0,83	0,68*
Batch-forsøg	Benzen	2,65	0,96*	0,78*
Mikrokosmos; intakte kerner	Benzen	2,68	0,97*	0,79*
Moræneler				
In-situ respirationstest	Benzin-TVOC	-	0,94	0,77*
Batch	Benzen	4,61	1,67*	1,36*
Mellemkornet sand				
Mikrokosmos; intakte kerner	Benzen	2,63	0,95*	0,78*
Silt				
Mikrokosmos; intakte kerner	Benzen	1,49	0,54*	0,44*

Tabel 4.1: 0. ordensrater (mg/kg TS/dag) fra en dyb umættet zone forurenet med benzin. Raterne er bestemt ved hhv. in-situ respirationsforsøg, ved traditionelle batch-forsøg i laboratoriet og ved laboratorieforsøg med intakte 100 cm^3 borekerner /19/. *: rate estimeret jf. ligning 6 (α = 1,07).

In-situ 1. ordensrater for BTEX, estimeret fra omfattende modelstudier på Flyvestation Værløse ligger i størrelsesorden 1-5 d^{-1} (omregnet til rater der er relateret til porevandsfasen fra rater rapporteret i gasfasen) /20/, hvilket således er i ganske god overensstemmelse med den 1. ordensrate for TVOC på 0,32-2,2 d^{-1}, der er estimeret i afsnit. 4.2.3.4, når det tages i betragtning, at DPD-testen er udført med ukendte VOC'er, ved en (lav) temperatur på ca. 7 °C og der er benyttet flere konservative tilgange til datatolkningen.

I /21/ er der lavet en sammenligning af nedbrydningsrater for BTEX fra et større antal batch-, kolonne- og feltstudier, hvor nedbrydningsraten (0. og 1. ordens) er relateret til porevandskoncentrationen. For det aktuelle koncentrationsniveau under DPD-testen på 1,3-8,8 mg/L ligger 95% konfidensintervallet for 0. ordensraterne i intervallet 1,7 - 240 mg BTEX/L/d (middel ca. 22 mg/L/d), mens DPD-estimatet ligger på 2,8 mg TVOC/L/d (jf. afsnit 4.2.3.3). Tilsvarende ligger 95 % konfidensintervallet for pseudo-1. ordensraterne i intervallet 0,22 – 110 d^{-1} (en middelværdi på ca. 4,8 d^{-1}), mens DPD-estimatet ligger i intervallet 0,32-2,2 d^{-1}. Sammenlignet med nedbrydningsraterne fra /21/ ligger de estimerede DPD-rater således i den lave ende af de rater, der er afrapporteret (formentlig bl.a. pga. en lavere temperatur) – men absolut i et realistisk (konservativt) leje.

Udover det aktuelle forureningsstof (ukendt VOC vs. benzen/benzin) har en lang række lokalitetsspecifikke faktorer indflydelse på konkrete nedbrydningsrater, hvorfor det generelt er vanskeligt, at sammenligne nedbrydningsrater fra forskellige lokaliteter. Overordnet set vurderes rateestimaterne fra DPD-

pilottesten dog, at ligge i et absolut realistisk leje, baseret på en sammenligning med rater fra /1/, /19/, /20/ og /21/.

4.2.3.6 Diskussion ift. anvendelse i JAGG 2.0

Ift. en praktisk anvendelse af 1. ordens rateestimaterne fra afsnit 4.2.3.4 i forbindelse med en JAGG 2.0-beregning for grundvandet på niveau 3, kan man – som det fremgår af ligning 5 – benytte den højeste porevandskoncentration (= koncentrationen i P1), idet man her vil opnå det mest konservative bud på 1. ordensraten. Når man befinder sig i regimet for 0. ordens nedbrydning mht. den koncentration der er benyttet i DPD-testen, er det dog væsentligt at pointere, at begge estimater rent faktisk er konservative.

Ofte vil det mest konservative (og tillidsskabende) rateestimat være rigeligt til at nedbrydningen bliver afgørende for risikovurderingen, jf. afsnit. 1.2. Og i forhold til benyttelse af en konservativ rate (JAGG 2.0 på niveau 2) er der, selv under stringent konservative antagelser – når nedbrydning kan dokumenteres med DPD-testen – rigeligt at hente ift. risikovurderingen. Dette understreges af, at det i /1/ er anbefalet, at anvende en konservativ 1. ordens nedbrydningsrate for BTEX på 0,01-0,1 d^{-1}, når det er dokumenteret, at betingelserne for nedbrydning er til stede og når der er tegn på at nedbrydningen foregår in-situ.

Forskellen imellem det konservative 1. ordensestimat, opnået ved DPD-testen, på 0,32 d^{-1} (med det forbehold, at testen er udført for ukendte TVOC'er) og den konservative rate på 0,01 d^{-1}, anbefalet i /1/, er om det tager ca. 2 eller 70 dage før halvdelen af stoffet bliver nedbrudt (halveringstiden).

5 Pilotforsøg: Diversitetsundersøgelse

5.1 Forsøgsbetingelser

5.1.1 Jordprøver

Hver jordprøve bestod af ca. 50 g jord opsamlet i redcap glas. Prøven er opbevaret på køl og er sendt til øjeblikkelig DNA-ekstraktion på Aalborg Universitet.

Den totale mængde mikrobiel DNA i hver af de udtagne jordprøver blev bestemt ved fem separate ekstraktioner. Der kunne ikke konstateres væsentlige forskelle i hverken udbytte (typisk 5-20 µg biomasse/g jord) eller DGGE-profilerne herfra (data ikke vist).

5.1.2 Indhold af flygtige kulbrinter i poreluften

På hver prøvetagningsposition for udtagning af jordprøve til DGGE-analyse er der også udført en poreluftscreening med PID-måler/ppbRAE. Dette er gjort med henblik på at få et øjebliksbillede af koncentrationen af flygtige kulbrinter i gasfasen, som de forskellige jordprøver - og dermed bakterierne - har været udsat for.

Undersøgelsen er udført med poreluftspyd, nedrammet til 1 m.u.t. Forud for udtagning af poreluftprøverne er opstillingen forpumpet med en luftmængde svarende til, at luften i rør og slanger er udskiftet ca. 50 gange. Poreluftprøverne er efterfølgende udtaget som poseprøver (ca. 2,5 L) i Rilsan poser ved brug af vakuumkasse og analyseret med PID-måler/ppbRAE.

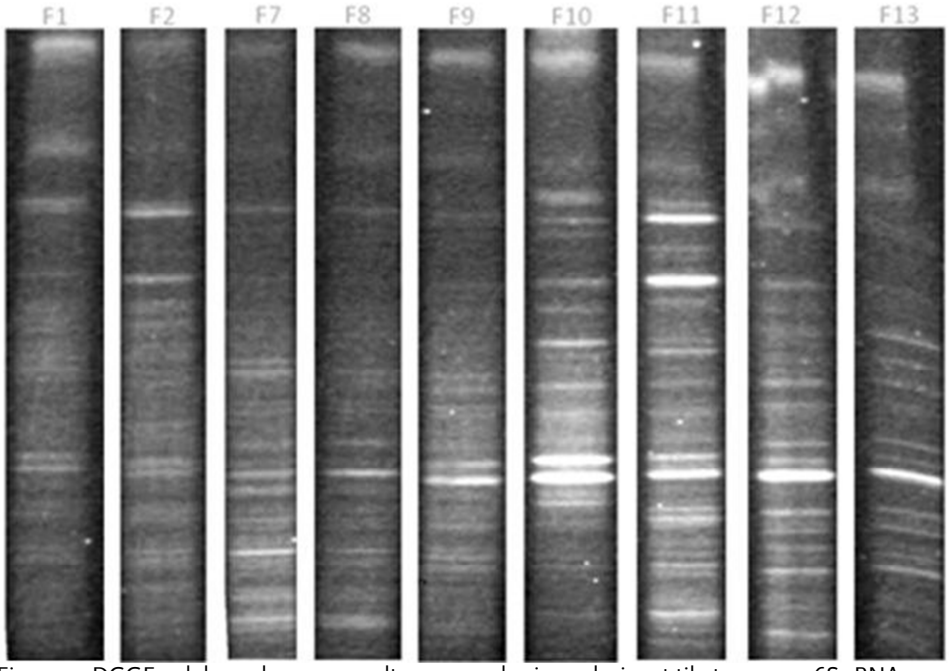
Resultatet af poreluftscreeningen fremgår af tabel 5.1 og er medtaget i PCA-analysen, sammen med artsdiversitet og intensitet bestemt ved DGGE-fingerprinting, jf. afsnit 5.2.1.1.

Punkt	Prøve/betingelser	ppb*
F1	Fyldsand; DPD-område før test	270
F2	Fyldsand; DPD-område efter test	>9999.000
F7	Fyldsand; upåvirket	110
F8	Fyldsand; evt. påvirket af lettere forurenet grundvand	310
F9	Fyldsand; evt. påvirket af lettere forurenet grundvand	280
F10	Intaktjord i restforurening	73.000
F11	Intaktjord i uforurenet område	160
F12	Referenceprøve i uforurenet fyldsand, intaktjord	64
F13	Referenceprøve i uforurenet fyldsand, intaktjord	53

Tabel 5.1: Resultater fra poreluftscreening for indhold af flygtige kulbrinter i punkter for udtagning af jordprøver til DGGE-fingerprinting. * Resultater > 10.000 ppb er foretaget med PID-måler kalibreret mod 100 ppm isobutylen; resultater <10.000 ppb er foretaget med ppbRAE kalibreret mod 10 ppm isobutylen.

5.2.1 Generel primer

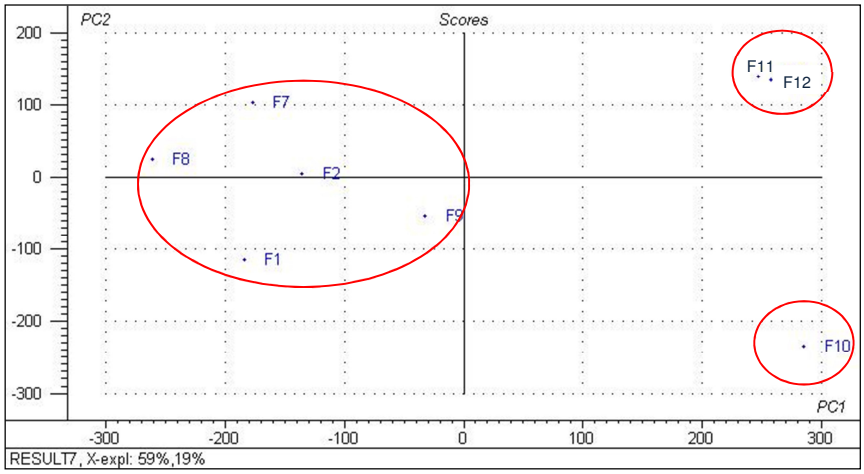
Som det fremgår af figur 5.1 er der ud fra de udtagne jordprøver opnået et stort antal bånd i DGGE analysen og dermed påvist en relativ stor artsdiversitet i de analyserede jordprøver. I det illustrerede eksempel er båndende fra den ene af referenceprøverne (prøve F13) forvreden på gelen, hvilket vanskeliggør den efterfølgende billedanalyse. I dette tilfælde er referenceprøven derfor ikke medtaget i PCA-analysen.



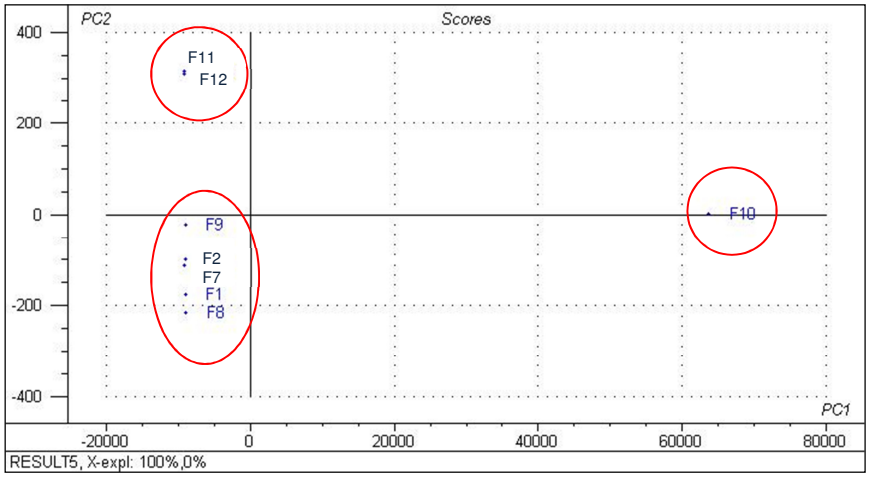
Figur 5.1: DGGE-gel, hvor der er anvendt en generel primer designet til at ramme 16S-rRNA genet for bakterier i jordprøverne (341F/518R primersættet).

5.2.1.1 PCA-analyse

Der er udført to forskellige PCA-analyser af datamaterialet til vurdering af statistiske ligheder eller forskelle i datamaterialet. I den første analyse indgår udelukkende artsdiversitet og antal genkopier i hvert bånd kvantificeret ved lysintensitet for båndet (figur 5.2), og i den anden analyse er indholdet af flygtige kulbrinter målt i ppb i prøvetagningsjorden også inddraget (figur 5.3).



Figur 5.2: PCA-analyse af artsdiversitet og båndintensitet fra DGGE-gelen.



Figur 5.3: PCA-analyse af artsdiversitet og båndintensitet fra DGGE-gelen samt koncentrationen af flygtige kulbrinter.

Det fremgår af figur 5.2 og 5.3, at begge de udførte PCA-analyser viser tre grupperinger:

1. F10 udtaget i intakt jord med restforurening.
2. F11 og F12 udtaget i uforurenede områder.
3. F1, F2, F7, F8 og F9 udtaget i den opfyldte udgravning, men med forskellige grader af mulig påvirkning fra restforureningen.

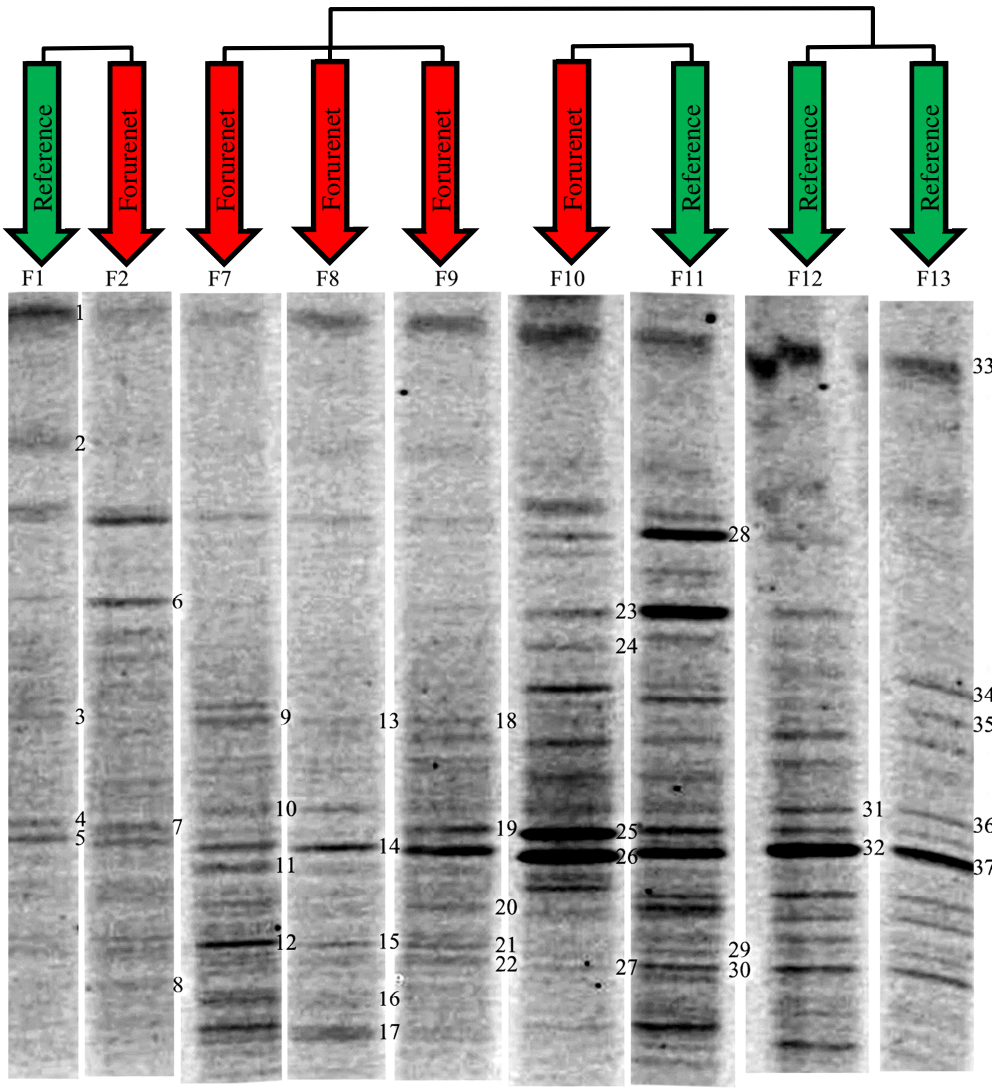
Af ovenstående ses en god sammenhæng mellem de statistiske grupper ved PCA-analysen og forventede forskelligheder ud fra prøveudtagningen. Umiddelbart er korrelationen indenfor gruppe 3 højere ved inddragelse af poreluft-ppb i analysen. Dette skal sandsynligvis tilskrives, at indholdet af flygtige kulbrinter i F10 var meget større end de resterende målinger, hvorved denne variabel får relativ stor indflydelse på PC1. Det er dog vigtigt at fremhæve, inddragelse af indholdet af flygtige kulbrinter i jorden ikke ændrer på grupperingerne, hvilket indikerer, at de grupperinger, der findes uden disse resultater (figur 5.2) følger variationen af koncentrationen af flygtige kulbrinter i poreluften (dvs. tilgængeligheden af oliekulbrinter).

Det fremgår endvidere af figur 5.2 og figur 5.3, at der ikke kan påvises forskel på prøverne F1 og F2, der er udtaget henholdsvis før og efter udførelse af en DPD-test. Der er således intet der tyder på, at tilførslen af benzen over en periode på 5-6 timer giver anledning til betydende mikrobiel vækst af de allerede tilstedeværende bakteriearter, eller til en fremvækst af nye arter, som udgør mere end ca. 1 % af biomassen. Om noget, indikerer disse resultater således, at de nedbrydningsrater der er estimeret på baggrund af DPD-testen er relateret til den mikrobielle population der var i jorden ved testens begyndelse.

En målbar ændring af jordens biodiversitet kræver sandsynligvis en påvirkning med forurening (dvs. en øget substrat-tilgængelighed) over en længere tidsperiode end det var tilfældet under DPD-testen. Dette stemmer overens med erfaringerne fra et større feltstudie på Flyvestation Værløse, hvor der blev placeret en kunstig kilde bestående af flygtige kulbrinter i umættede aflejringer af fint sand. Over en periode på 3 måneder kunne der her kun observeres en begrænset effekt af kulbrinteforureningen på størrelsen af jordens mikrobielle population /22/. Dette blev dog undersøgt ved dyrkningsbaserede metoder, som alt andet lige har en betydelig mindre følsomhed end det er tilfældet ved DGGE analysen.

5.2.1.2 Artsbestemmelse

Som beskrevet ovenfor er udvalgte bånd fra DGGE-profilerne klippet ud og sekventeret for at bestemme identiteten af de mikroorganismer, som sekvenserne stammer fra. Af figur 5.4 fremgår gelen, med en oversigt over de bånd, der er skåret ud.



Figur 5.4: DGGE gel der angiver hvilke bånd der er skåret ud til fylogenetisk identifikation. Tallene angiver bånd der klippet ud og sekvensidentificeret (jf tabel 5.2). Referenceprøver og forurenede prøver der hører sammen er illustreret med de farvede kombinationsdiagrammer over gelen.

Som det fremgår af figur 5.4 er der skåret 37 bånd ud som er sendt til sekventering og efterfølgende fylogenetisk identifikation. Den fylogenetiske bestemmelse af identiteten i de forskellige udskårne bånd fremgår af tabel 5.2. Det er tilstræbt, at udvælge båndende med henblik på at identificere bakterier, der findes i prøver, som er udsat for flygtige kulbrinter. Dette gøres ved at sammenligne med den tilsvarende baggrundsprøve som geologisk har samme karakteristik, men som ikke er påvirket af forureningen. F11 er således geologisk sammenlignelig med F10, mens F12 og F13 er sammenlignelig med F7-F9. F7-F10 er alle karakteriseret ved at være påvirket af flygtige kulbrinter i forskellig grad. Endvidere er F1 og F2 udtaget før og efter DPD-forsøget på samme sted og i samme dybde.

Bånd nr.	Jordprøve	Nærmeste slægtning i GenBank
1	F1	*Flavobacterium* sp.
2		*Polaromonas naphthalenivorans*
3		*Methylophilaceae* sp.
4		*Flavobacterium* sp.
5		*Nitrosospira* sp.
6	F2	*Burkholderiales* sp.
7		*Flavobacterium* sp.
8		*Firmicutes* sp.
9	F7	*Flavobacterium limicola*
10		*Burkholderiales* sp.
11		*Collimonas* sp.
12		*Massilia sp.*
13	F8	*Flavobacterium limicola*
14		*Nitrosospira* sp.
15		*Massilia sp.*
16		*Procabacteriaceae* sp.
17		*Rhodocyclaceae* sp.
18	F9	*Flavobacterium limicola*
19		*Oxalobacter* sp.
20		*Sphingobacteriales* sp.
21		*Massilia sp.*
22		*Flavobacterium sp.*
23	F10	*Thiobacter* sp.
24		*Oxalobacter sp.*
25		*Oxalobacteraceae* sp.
26		*Nitrosospira* sp.
27		*Flavobacterium sp.*
28	F11	*Sutterellaceae* sp.
29		*Massilia sp.*
30		*Flavobacterium sp.*
31	F12	*Nitrosospira* sp.
32		*Nitrosospira* sp.
33	F13	*Clostridium* sp.
34		*Azoarcus* sp.
35		*Herbaspirillum* sp.
36		*Burkholderiales* sp.
37		*Nitrosospira* sp.

Tabel 5.2: Identifikation af de udskårne bånd fra DGGE (jf figur 5.4).

Det fremgår endvidere af figur 5.4, at flere bånd ikke er sekventeret. Dog er det tilstræbt at sekventere mindst et bånd fra hver båndrække som visuelt vurderet går igen i alle prøver, eks. bånd nr. 1, 2, 28 og 33.

Selvom PCA-analysen overordnet grupperer F1 og F2 i samme gruppe, er der også mindre forskelle i rækkefølgen af bånd mellem F1 og F2, og det kan visuelt vurderes, at den største forskel i intensitet ligger i bånd nr. 1, 2, 3 og 6. Bånd nr. 6, som har højere intensitet i F2 end i F1, er identificeret som en bakterie tilhørende ordenen *Burkholderiales*. Endvidere findes et kraftigt bånd mellem 2 og 6, som ligeledes har højere intensitet i F2 end i F1. Desværre var det ikke muligt at identificere sekvensen bag dette bånd. Det er uvist om disse forskelle i de to prøver skyldes vækst eller naturlige variationer i prøvematerialet og det kan ikke udelukkes, at hele eller dele af forskellen mellem F1 og F2 kan tilskrives mindre lokale forskelle i diversiteten i jorden.

Sammenholdes F7-F9 indbyrdes visuelt, fremgår det, at der er rimelig overenstemmelse i båndrækkefølgen imellem de tre jordprøver, dog med forskellige intensiteter i de tre prøver. Sammenholdes med den fylogenetiske identifikation, fremgår det endvidere, at bånd som visuelt kan vurderes at ligge på identiske positioner i gelen også sandsynligvis stammer fra den samme art. Som eksempel kan nævnes bånd nr. 9, 13 og 18, som alle er identificeret som *Flavobacterium limicola* og bånd nr. 12, 15 og 21, som alle er identificeret som *Massilia* sp. Tilsvarende bånd går dog igen i F12 og F13, hvorfor de samme arter sandsynligvis er til stede i disse prøver selvom dette ikke fremgår af tabel 5.2. Sammenholdes F7-F9 med F12 og F13, kan der ikke visuelt identificeres markante afvigende bånd, dog skal det bemærkes, at der er relativt mange bånd, hvilket vanskeliggør en visuel vurdering af forskellene.

Den mest markante forskel der visuelt kan ses af figur 5.4 er forskellen i båndrækkefølgen mellem F10 og F11, hvor også intensiteterne varierer markant. Det er således iøjnefaldende, at antallet af bånd ser ud til at være reduceret i den forurenede prøve (F10) i forhold til referenceprøven (F11), hvilket kan indikere, at væksten udgøres af en gruppe af bakterier, som er specialiseret i netop nedbrydning af gasolieforureningen i umættet zone. De mest markante bånd i F10 er nr. 25 og 26, der er identificeret som henholdsvis *Oxalobacteraceae* sp. og *Nitrosospira* sp. Disse er dog begge også repræsenteret i F11, bare med en lavere intensitet indikerende, at de ikke er specifikke for prøver med jordforurening.

Den fylogenetiske analyse viser en tæt relation mellem mikroorganismer i de udtagne jordprøver og mikroorganismer, der tidligere er identificeret i jordforurenede områder. Eksempelvis er der i jordprøve F1 fundet en sekvens (bånd nr. 2) der har *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 som tætteste beslægtede organisme. Denne stamme er tidligere beskrevet som værende ansvarlig for nedbrydningen af naphthalen i olieforurenet sediment /23/. Tilsvarende er to andre stammer ligeledes tættest relateret til andre mikroorganismer, der har været relateret til olieforurening, mens endnu tre andre tilhører en gruppe af ammoniumoxiderende bakterier (Nitrosospira sp.) og derfor ikke forventes at være direkte relateret til olieforureningen.

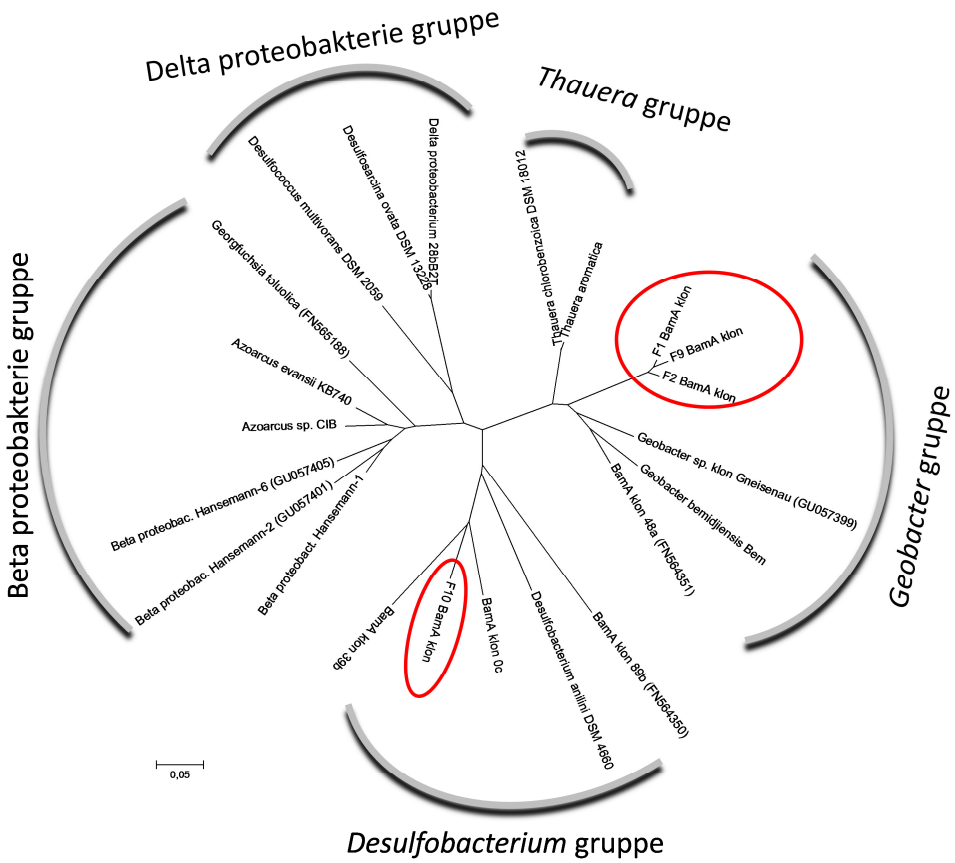
Samlet set, er det ikke på baggrund af den fylogenetiske identifikation muligt, at konstatere generelle tendenser som indikerer tilstedeværelsen af egentlige indikatororganismer for nedbrydning af flygtige kulbrinter i den umættede zone. Dog er der forskelle i båndrækkefølge og/eller intensitet mellem forurenede prøver og referenceprøver som ikke kan afvises, at kunne tilskrives tilstedeværelsen af gasolie. De identificerede arter er dog ikke obligate nedbrydere af gasolie og kan derfor ikke bruges direkte som indikatorer for nedbrydning af oliekomponenter i umættet zone.

5.2.2 6-OCH-CoA og PAH dioxygenase-gener i jordprøverne

Amplificering af de to ringhydrolyserende PAH dioxygenase kodende gener og 6-OCH-CoA hydrolase-generne (monoaromater) i jordprøverne viste kun positive bånd på DGGE gelen for 6-OCH-CoA hydrolase-generne (monoaromater). Det har således ikke været muligt at få resultater for identifikation af PAH dioxygenase kodende gener.

DGGE-analysen for 6-OCH-CoA hydrolase-generne afslørede fire bånd fra hver af prøverne F1, F2, F9 og F10, mens et ekstra bånd blev identificeret i F10. De fire bånd i F1, F2, F9 og F10 var placeret på samme position i gelen,

hvilket indikerer at det er den samme organisme, mens det ekstra bånd i F10 blev identificeret på en anden position i gelen. Dette indikerer således tilstedeværelsen af to typer af organismer der bærer genet for 6-OCH-CoA hydrolase. Båndende blev skåret ud, og sekventeret, og sekvenserne er efterfølgende analyseret og nærmeste beslægtede organismer er identificeret. Resultatet fremgår af det fylogenetiske træ i figur 5.5. Det begrænsede antal af bånd medfører endvidere, at en PCA-analyse ikke er nødvendig for at finde gruppe-ringer prøverne imellem.



Figur 5.5: Fylogenetisk træ der viser forskellige varianter og deres indbyrdes slægtskab af forskellige 6-OCH-CoA hydrolase gener (BamA).

Som det fremgår af figur 5.5, er der alt andet lige tale om særdeles nært beslægtede kloner i F1, F2 og F9, som alle hører under slægten *Geobacter*, mens den nærmest beslægtede art, som er identificeret i F10 er relateret til slægten *Desulfobacterium*. Da der ikke er konstateret positive bånd i referenceprøverne, indikerer dette, at det anvendte primersæt, har et potentiale for kvalitativ identifikation af nedbrydning i umættet zone.

6 Diskussion og perspektiver

I de foregående kapitler er der udført pilotforsøg med to nye metoder, som er vurderet at kunne have potentiale til dokumentation af naturlig nedbrydning af oliestoffer i den umættede zone, herunder anvendelse sammen med JAGG 2.0 i forhold til risikovurdering for det førstkommende grundvandsmagasin. Metoderne repræsenterer således mulige alternativer til allerede eksisterende værktøjer og undersøgelsesstrategier beskrevet i et Teknologiprojekt fra Miljøstyrelsen /2/.

De to metoder er hhv. DPD-testen, der vurderes at have potentiale til anvendelse på niveau 2 (kvalitativ dokumentation) og 3 (kvantitativ dokumentation) sammen med JAGG 2.0, og mikrobiologisk diversitetsundersøgelse, der vurderes at have potentiale til anvendelse på niveau 2 (kvalitativ dokumentation).

6.1 DPD-testen

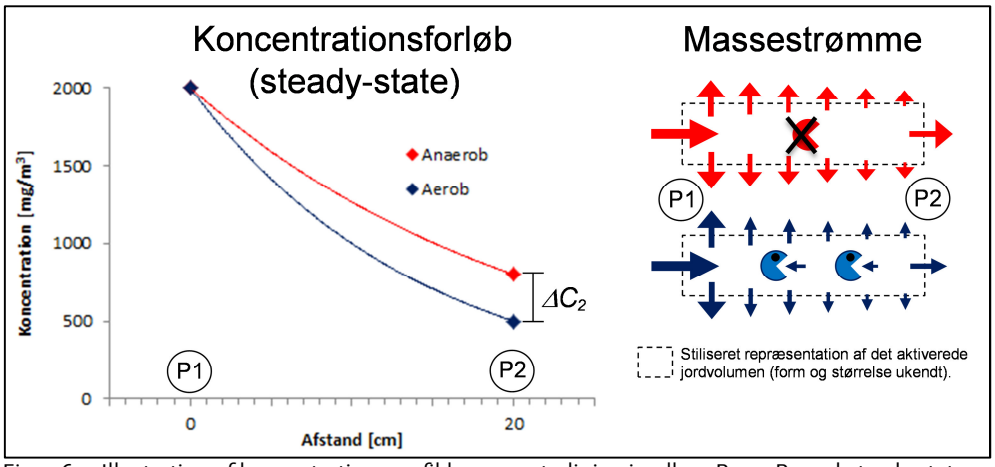
Dual Point Degradation testen (DPD-testen) er en feltbaseret fremgangsmåde til kvalitativ og kvantitativ karakterisering af potentialet for nedbrydning af benzin- og oliekomponenter i jordens umættede zone. I det følgende diskuteres og perspektiveres anvendelsen af DPD-testen sammen med JAGG 2.0.

6.1.1 Estimatet på det diffusive tab giver et konservativt rateestimat

Det antages, at den anaerobe test udelukker aerob nedbrydningsaktivitet mellem P1 og P2. Hvis der alligevel foregår en nedbrydning under den anaerobe testdel (f.eks. en anaerob nedbrydning eller en aerob nedbrydning i aerobe mikrozoner) bliver det endelige bud på den aerobe nedbrydningsrate konservativt, da massetabet under den anaerobe test ($T_{anaerob}$) således repræsenterer et diffusivt tab og et eventuelt (mindre) tab til nedbrydning.

Under den anaerobe test vil koncentrationen i jordmatricen være højere end under den aerobe test, da nedbrydningen er mindre/ubetydelig. Ved en højere koncentration langs centerprofilet imellem P1 og P2 vil der ligeledes opstå en større koncentrationsgradient imellem centerprofilet og den omgivende matrice. Derved vil det diffusive tab under den anaerobe test, alt andet lige, være en smule større end under den aerobe test.

Under estimeringen af det aerobe massetab (jf. ligning 3), fratrækkes derfor et konservativt bud på det aerobe diffusive tab. Situationen er illustreret i figur 6.1, hvor koncentrationen langs centerprofilet imellem P1 og P2 er højere for den anaerobe test, hvorfor det diffusive massetab er større for den anaerobe test. Kilden til dette er den manglende (eller meget lille) nedbrydning under den anaerobe testdel.



Figur 6.1: Illustration af koncentrationsprofil langs centerlinjen imellem P1 og P2 ved steady-state, samt betydningen for massestrømmene for det aktiverede jordvolumen (større diffusivt tab under den anaerobe testdel). $T_{nedbrydning}$ estimeres på baggrund af ΔC_2.

Det kunne overvejes, at gennemføre et testforløb bestående af følgende sekventielle forsøgsrække: Aerob – anaerob – aerob, hvorved det ville være muligt, at se om den aerobe rate kan reproduceres. I bekræftende fald ville det være med til at skabe tillid til den opnåede aerobe nedbrydningsrate.

6.1.2 Fysisk konfiguration af feltopstillingen

Som det fremgår af afsnit 4.2.3.1 er estimatet på nedbrydningsraten for DPD-pilottesten (et forholdsvist lille tal) fremkommet ved at trække to store tal fra hinanden. Dette er uhensigtsmæssigt da forholdsvist små usikkerheder i testbetingelser (flow, koncentrationsniveauer m.v.) vil medføre ganske store usikkerheder i det endelige rateestimat.

Denne pointe sættes i perspektiv blot ved at ±2 % tolerance på de leverede standardgasser – i værste fald – vil kunne "æde" ca. 80 mg TVOC/dag (over halvdelen!) af den estimerede rate på 150 mg/dag. Derved kunne den estimerede rate have været 70 mg TVOC/dag, blot som følge af usikkerheder på koncentrationen af de leverede standardgasser.

Med yderligere ±10 % RSD på kulrørsanalyserne, kunne resultaterne fra pilottesten ligeså godt have vist hhv. 285 og 328 mg TVOC/m^3, og så ville den estimerede nedbrydningsrate have været 62 mg TVOC/dag. Dertil kommer at de akkrediterede analyseresultater afrundes til to betydende cifre i analyserapporten, hvilket måske bedst klares ved ikke at bede om en akkrediteret analyse (og dermed ikke-afrundede tal) eller ved at benytte f.eks. en felt-GC til løbende kontrol af kulbrinteniveauet i P2, se også afsnit 6.1.4. Det ville være en fordel med et apparat, der ikke (som PID-måleren) er følsomt overfor indholdet af ilt eller kuldioxid i den oppumpede luft.

Akkumuleres analyseusikkerheden med usikkerhederne fra standardgasserne ses det, at det ikke længere ville have været muligt at påvise nedbrydning under de givne forudsætninger.

Efter ovenstående diskussion står det således klart, at der bør arbejdes videre med at justere den fysiske konfiguration af feltopstillingen med henblik på at minimere det diffusive tab under testen; svarende til at de to tal der trækkes fra hinanden bliver mindre, hvormed følsomheden på rateestimatet – alt andet lige – øges.

Åbenlyse punkter at arbejde videre med er bl.a. afstanden mellem P1 og P2 og antal og placering af hullerne i poreluftspyddene. En systematisk undersøgelse af disse faktorers betydning vil gøre det muligt at minimere det diffusive tab under testen og dermed opnå en større sikkerhed på det opnåede rateestimat.

Det kunne også overvejes at etablere et målepunkt i midten – specielt ved længere afstande imellem P1 og P2 – for at kontrollere "middelforholdene" mht. koncentrationerne af ilt, CO_2 og kulbrinter under testen.

6.1.3 Større dybder og rumlige variationer

I forhold til anvendelse sammen med JAGG 2.0, der retter sig imod problemstillingen omkring den dybe umættede zone imellem en "hængende" forurening og det førstkommende grundvandsmagasin, er det åbenlyst, at der bør arbejdes med at kunne udføre en betryggende installation af poreluftspyd/-stationer i større dybder end under pilotforsøget; gerne i flere dybder under den samme forurening. Herunder kunne det være relevant, at afprøve installation af to filtre med vertikal adskillelse i stedet for med horisontal adskillelse, da der i givet fald kunne nøjes med én boring til udførelse af installationerne. Den praktiske udførelse af to dybe filtre med lille indbyrdes horisontal adskillelse kunne volde problemer. Ved udførelse af filtre med vertikal adskillelse (frem for horisontal adskillelse) er det dog vigtigt, at være opmærksom på eventuelle lagdelinger i/omkring de horisonter der filtersættes.

Dertil er det relevant at arbejde med at dokumentere nedbrydningen i forskellige punkter i planen, med henblik på at undersøge den rumlige variation i nedbrydningsraterne, da der pt. kun eksisterer meget sparsom viden om de rumlige variationer i in-situ nedbrydningsrater. Der eksisterer således ikke pt. noget erfaringsgrundlag, der kan pege i retning af hvor mange in-situ målinger der er nødvendige for at få en passende arealmæssig dækning ift. at udføre betryggende risikovurderinger med inddragelse af nedbrydning.

6.1.4 Gasblandinger: Komponenter og koncentrationer

I den gennemførte pilottest var det lagt op til at teste DPD-metoden ved anvendelse af benzen i hhv. en aerob blanding (benzen og 21 % ilt, balanceret med kvælstof) og en anaerob blanding (benzen i kvælstof).

Benzen var udvalgt som initialt modelstof, idet netop benzen meget ofte viser sig at være drivende for risikovurderinger på benzin- og olieforureninger. Dertil kommer, at den benzen-nedbrydende aktivitet forventes at være en indikator for potentialet for kulbrintenedbrydning på i hvert fald benzinforurenede lokaliteter /24/.

I forhold til fremtidige anvendelser af metoden, er det væsentligt, at metoden, i sin nuværende form, primært retter sig imod én forureningskomponent ad gangen (benzen eller en anden komponent). Dette skyldes dog, at testen i sin nuværende form anvender en PID-måler til vurdering af hvornår der er opnået steady-state imellem masseinput, processer og masseudtræk. Ved benyttelse af f.eks. en felt-GC med mulighed for at adskille forskellige forureningskomponenter ville det være muligt, at benytte en syntetisk forureningssammensætning bestående af flere forskellige komponenter i forskellige koncentrationer. Begge testforløb skulle i dette tilfælde blot forløbe til der var opnået steady-state for samtlige komponenter, der ville indstille sig på forskellige tidspunkter afhængigt af de enkelte stoffers effektive retardationsfaktorer i jordmatricen.

Der er således principielt mulighed for at testen kan gennemføres med en vilkårlig kombination af forureningskomponenter, og –koncentrationer. Det eneste krav er, at der er tale om samme blanding af stoffer og koncentrationer i den aerobe og den anaerobe testdel. Det er ligeledes muligt, at gennemføre den aerobe testdel med en iltkoncentration der svarer til in-situ iltkoncentrationen. Måles der f.eks. 12 % ilt i den undersøgte matrice bestilles der blot en aerob gasblanding med 12 % ilt i stedet for en koncentration svarende til atmosfæreindholdet (21 %). Ved en indledende rundspørge til andre gasproducenter har f.eks. Air Liquide oplyst, at det er muligt, at få fremstillet gasblandinger med en valgfri sammensætning (af f.eks. benzen, kvælstof og ilt) med en renhed på +/- 2 % (pris omkring 3 - 4.000 kr. + moms).

I forhold til den nuværende strategi med at benytte modelstoffet som sin egen interne tracer i hhv. en aerob og en anaerob testdel, er det ligeledes en mulighed at benytte andre tracere (f.eks. CO) under ét enkelt (aerobt) testforløb til indikation af det diffusive massetab under testen; eller den mass recovery der opnås i P2 ift. den koncentration der påføres systemet i P1. Det er i den forbindelse blot vigtigt, at koncentrationen og diffusionskoefficienten for traceren (om noget) vælges højere end for modelstoffet, da det diffusive tab af modelstoffet i så fald overestimeres, hvorved den estimerede nedbrydningsrate bliver konservativ.

6.1.5 En høj gaskoncentration i in-situ testen giver konservativt rateestimat

I dette projekt var det stilet mod at anvende en benzen-koncentration på 2.000 mg/m^3, hvilket er højt ift. praktiske problemstillinger med benzen i en afskærende zone imellem selve jordforureningen og grundvandet, jf. anvendelsesområdet defineret i henhold til JAGG 2.0. Realistiske, høje niveauer vil måske snarere ligge omkring 1 mg/m^3. Man kunne dermed have en berettiget bekymring om, at de høje koncentrationsniveauer ville lede til en forkert (for høj?) nedbrydningsrate.

Selve koncentrationen af forureningsstoffet er dog kun betydende for nedbrydningsraten i forholdsvist lave koncentrationer. På baggrund af Michaelis-Menten kinetik vil nedbrydningen foregå som 1. ordens proces (raten er koncentrationsafhængig) ved koncentrationer meget lavere end K_m (halvmætningskonstanten), og som en 0. ordens proces (raten er uafhængig af koncentrationen) ved koncentrationer meget højere end K_m /25/. K_m for BTEX ligger formentlig i størrelsesordenen 0,2 mg/L porevand /21/.

Da pilottesten efter alt at dømme er gennemført med porevandskoncentrationer på mellem ca. 1 og 9 mg/L er det realistisk at antage, at det opnåede 0. ordens rateestimat på 0,12 mg/L/d kan forventes at ligge i 0. ordens regimet; dvs. hvor den faktiske nedbrydningsrate er uafhængig af stofkoncentrationen.

Om testen havde været gennemført med en porevandskoncentration på 1, 9 eller 30 mg/L ville dermed kunne forventes at give nogenlunde samme 0. ordens rateestimat.

Ved efterfølgende at omregne 0. ordens estimatet til et pseudo 1. ordens estimat, via ligning 5, ved at dividere med koncentrationen, ses det let, at estimatet bliver mere konservativt jo højere en koncentration der har været benyttet. Dette er i tråd med resultaterne fra /21/, og forudsætter, at der ikke sker en betydende vækst af biomassen under testen.

6.1.6 Øvrige perspektiver for videreudvikling og dokumentation

Som det fremgår af ovenstående er der, i forhold til den gennemførte pilottest, en række punkter der bør undersøges yderligere før testen kan anvendes rutinemæssigt sammen med JAGG 2.0. Dertil kan man forestille sig en række øvrige forbedringer, der vil kunne ville styrke testen – ikke mindst i en udviklingsfase. Her nævnes yderligere to perspektiver for det videre arbejde:

- Der opstilles en 3D-model til beskrivelse af flowforholdene mellem/-omkring P1 og P2, herunder evt. under lagdelte forhold. Dette vil forbedre procesforståelsen og være en hjælp ved estimering af såvel det aktiverede jordvolumen som nedbrydningsraten (både 0. ordens og 1. ordens rater), ligesom det vil være muligt at forhåndsestimere/-designe en given test ved at inddrage viden om jordtype og –tilstand (vandindhold og f_{oc}), forureningskomponenter og afstand vs. tid og følsomhed i rateestimatet.
- Der benyttes stabile isotoper (både ^{13}C og ^{2}H) til at dokumentere nedbrydningen under testforløbet. Brugen af stabile isotoper vurderes at kunne være med til at mindske usikkerheden i tolkningen af nedbrydningsgrader og rateestimaterne.

6.1.7 Potentiale for anvendelse sammen med JAGG 2.0

På baggrund af den gennemførte pilottest, og ovenstående diskussion, vurderes DPD-testen at have et stort potentiale ift. kvalitativ og kvantitativ dokumentation af in-situ nedbrydning af oliekulbrinter i jordens umættede zone, herunder specielt sammen med risikovurderinger udført med JAGG 2.0.

DPD-testen er hurtig, operationel og forekommer omkostningseffektiv ift. de (øvrige) metoder, der hidtil er publiceret /2/.

Specielt for hele konceptet omkring DPD-testen er også, at usikkerhederne omkring testens gennemførelse og datavurderingen, håndteres på en måde som gør at det resulterende rateestimat bliver konservativt (mindre end den faktiske nedbrydningsrate). Derfor vurderes det, at hvis DPD-testen viser en målbar nedbrydning, så vil der med stor sikkerhed reelt være potentiale for nedbrydning på lokaliteten, hvilket vil være med til at skabe tryghed omkring de risikovurderinger der baseres på nedbrydningsdata opnået med DPD-testen.

Det anbefales at der arbejdes videre med de opstillede perspektiver:

1. Den fysiske konfiguration.
2. Instrumentering (felt-GC).
3. Gasblandinger der passer til feltlokaliteten.
4. 3D-modellering af flowfelt og anvendelsesområde.
5. Installation i flere dybder og punkter i planen.
6. Brugen af stabile isotoper.

Ovenstående arbejde kan meget vel udføres på én eller flere konkrete benzin- eller olieforurenede lokaliteter, hvor dokumentation af nedbrydning eller konkrete estimater på nedbrydningsrater vil kunne støtte i beslutningsprocessen.

6.2 Diversitetsundersøgelse

Diversitetsundersøgelse er en kvalitativ metode til karakterisering af potentialet for nedbrydning af benzin- og oliekomponenter i jordens umættede zone. Overordnet set er der testet to tilgange, dels gennem anvendelse af DGGE fingerprinting med universelle primere og dels samme strategi med anvendelse af funktionelle primere rettet mod gener, der koder for enzymer der indgår i nedbrydning af oliekomponenter.

Fordelen ved anvendelse af universelle primere er, at chancen for falsk negative minimeres, idet karakteriseringen af, at der foregår nedbrydning identificeres ved sammenligning af artssammensætningen i forurenede og uforurenede jordprøver. Denne tilgang har endvidere den fordel, at arter der indgår i nedbrydningen efterfølgende kan identificeres På sigt forventes dette at medføre, at der identificeres specifikke arter, der kan bruges som indikatororganismer for nedbrydning. Dette vil endvidere medføre en betydeligt mindre arbejdsbyrde og pris, idet DGGE trinet er relativt tidskrævende sammenlignet med PCR, hvor der kun ledes efter en bestemt art eller et gen. Fordelen ved anvendelse af de specifikke primere er, at det er relativt hurtigt, og DGGE delen kan udelades. Det kan dog ikke med de undersøgelser der er udført indtil nu konkluderes om der nogle steder forekommer falske negative, eksempelvis fordi der forekommer arter, som benytter sig af hidtil ukendte nedbrydningsveje/enzymer.

I det følgende diskuteres og perspektiveres anvendelsen af diversitetsundersøgelse i relation til JAGG 2.0.

6.2.1 Potentiale for anvendelse sammen med JAGG 2.0

Samlet set er der afdækket et potentiale for anvendelse af DGGE fingerprinting sammen med JAGG 2.0. Det var således muligt via anvendelse af generelle bakterielle primere og PCA-analyse, at gruppere prøverne fra pilotforsøget ud fra deres DGGE fingerprint. PCA analysen viste hvad der kunne forventes set i lyset af påvirkning fra flygtige kulbrinter. Endvidere blev der afdækket et potentiale for at lede efter funktionelle gener, der specifikt koder for nedbrydning af oliekomponenter, eksemplificeret ved genet kodende for 6-OCH-CoA hydrolase.

Uanset om der anvendes generelle bakterielle primere eller specifikke primere, rettet mod specifikke funktionelle gener, har metoden den fordel, at der analyseres direkte på prøver udtaget fra felten uden forudgående dyrkningstrin. Endvidere er analysen relativt hurtig idet selve analysen kan udføres i løbet af 1-2 dage. Vurderingen hvor de generelle primere anvendes kan udelukkende baseres på sammenligning mellem forurenede prøver og referenceprøver fra samme lokalitet. De specifikke primere har potentiale til kun at skulle anvendes på prøver der er forurenede, idet karakterisering af funktionen med olienedbrydning, ligger i designet af primeren.

I forhold til anvendelse af de generelle bakterielle primere vurderes det, at kombinationen med PCA-analyse er en nødvendighed, idet der i jord ofte vil være en så stor artsdiversitet, at forskelle og ligheder ikke kan identificeres visuelt. Til sammenligning er anvendelsen af primere for funktionelle gener mere specifik, og - vurderet på baggrund af resultaterne fra pilotforsøget - konservativ i forhold til identifikation af potentialet for nedbrydning i umættet zone. Dette skyldes, at diversiteten er betydelig mindre for fraktionen af bakterier der bærer de gener som primerne er designet til ramme. Resultaterne in-

dikerer således, at det ikke er nødvendigt med DGGE og efterfølgende PCA-analyse for at identificere de positive prøver. Et positivt bånd på en PCR gel er i princippet nok. Det skal dog bemærkes, at de funktionelle gener ikke blev detekteret i alle prøver, hvor det på forhånd var vurderet sandsynligt, at de ville blive fundet. Endvidere kan det nævnes, at man naturligvis kun (i bedste fald) kan finde de gener man leder efter, og at nedbrydningen af BTEX og oliekulbrinter endnu ikke er et velbeskrevet område, rent forskningsmæssigt. Det vurderes således sandsynligt, at der indenfor en kortere årrække vil ske en massiv forskning på området, der vil muliggøre valg af primer-pakker rettet mod forskellige funktionelle gener der indgår i nedbrydning af oliekomponenter.

Sammenlignes resultaterne fra dette studie, er det bemærkelsesværdigt, at der opnås rimeligt samstemmende grupperinger af jordprøverne ved anvendelse af generelle primere og PCA-analyse og ved anvendelse af de specifikke primere, selvom de specifikke primere ikke påviser potentiale for nedbrydning i F7 og F9. Det er således samlet set underbygget med to forskellige analyser, at der er potentiale for nedbrydning i F1, F2, F9 og F10, mens kun den ene analyse finder forskel på referenceprøver og forventede forureningspåvirkede prøver i F7 og F8. Ingen af metoderne indikerer nedbrydningspotentiale i referenceprøverne.

6.2.2 Perspektiver for videreudvikling og dokumentation

Anvendelse af DGGE sammen med generelle primere og PCA forventes, at være nødvendig på nuværende tidspunkt, idet de specifikke primere kun er afprøvet i det omfang som er præsenteret i denne rapport. DGGE og sekventering af bånd som træder frem i forurenede prøver, vil endvidere medvirke til, at der identificeres egentlige indikatorarter eller flere funktionelle gener, således at metoden på sigt kan reduceres til PCR rettet mod disse, hvilket vil gøre denne tilgang betydelig nemmere og billigere.

Det vurderes på baggrund af ovenstående, at der er behov for yderligere tests af metoden for at tilvejebringe et bedre statistisk grundlag for at sikre metodens specificitet og sikre, at metoden er konservativ i forhold kvalitativ dokumentation af nedbrydning og anvendelse til risikovurdering, sammen med en konservativ nedbrydningsrate fra litteraturen.

Endvidere vurderes det, at et omfattende litteraturstudie muligvis kan afdække flere primersæt, som kan anvendes til at forbedre metoden. Ikke mindst i forhold til andre enzymer som specifikt indgår i nedbrydning af andre oliekomponenter. I sidste ende, kan dette lede til, at der udelukkende udføres test på prøver fra områder, hvor der er interesse for at undersøge om der foregår nedbrydning; ikke fra uforurenede referenceprøver.

I forhold til andre olietyper, vurderes både de generelle primere og dem der specifikt er designet til at ramme genet for 6-OCH-CoA hydrolase hos fakultativt og anaerobe ringhydrolyserende bakterier, at kunne anvendes. Dette skyldes, at gasolie som prøverne fra nærværende test er forurenet med, har et relativt lavt indhold af monoaromater sammenlignet med eks. benzin. Dermed vil der sandsynligvis være flere monoaromatnedbrydere i benzin-forurenet jord, hvilket muligvis også medfører, at artsdiversiteten er større, hvorved PCA-analysen også kan blive nødvendig for detektion med specifikke primere. Dette bør også indgå i yderligere tests inden metoden endeligt anbefales som en kvalitativ metode til dokumentation for naturlig nedbrydning i umættet zone.

I dette projekt er der endvidere taget et skridt ud over DGGE fingerprinting, nemlig sekventering af bånd fra DGGE gelen. Denne del har ikke umiddelbart afdækket noget brugbart potentiale, idet gelen i sig selv var mere informativ, og da der p.t. ikke foreligger nok kendskab til specifikke indikatororganismer. Men på længere sigt, kan der muligvis vise sig arter, som ofte viser sig i forbindelse med nedbrydning af oliestoffer i umættet zone, hvorved der kan ledes efter egentlige indikatororganismer. Er dette muligt, vil der kunne designes primere specifikt mod disse arter, således der udelukkende skal køres en PCR analyse (dvs. uden DGGE trinnet) hvilket vil gøre metoden endnu hurtigere. Lignende strategier findes allerede for indikatororganismer for nedbrydning af MTBE og PCE/TCE.

Sammenlignes resultaterne, vurderes det, at det største potentiale ligger i videreudvikling af anvendelsen af de specifikke primere, herunder en tilbundsgående litteratursøgning efter anvendelige primere, som kan testes og muligvis indgå som en del af værktøjskassen, evt. delt på forskellige forureningstyper. Endvidere er det nærliggende at teste primerne, der er anvendt i dette studie på flere lokaliteter og med en større prøvetagningsfrekvens for at tilvejebringe den rette dokumentation for metoden inden rutinemæssig anvendelse i forbindelse med risikovurdering.

7 Referencer

/1/ Christensen, A.G., P. Binning, M. Troldborg, P. Kjeldsen, M. Broholm. Opgradering af JAGG til version 2.0 Vertikal transport ned til førstkommende betydende magasin (udkast). Miljøstyrelsen, 2007.

/2/ Muchitsch, N., A.G. Christensen, P. Loll og A.H. Kristensen. Litteraturgennemgang af strategier til dokumentation af nedbrydning I den umættede zone (udkast). Miljøstyrelsen, 2011.

/3/ Loll, P., N. Muchitsch og A.G. Christensen. Hvad med nedbrydning i JAGG 2.0? ATV-møde: JAGG med "face lift" og større motor. 16. juni 2010.

/4/ Loll, P.. Oprensning af olie- og benzinforureninger – status for naturlig nedbrydning og biologiske afværgeteknikker med fokus på olie og benzinforureninger. ATV-møde: Afværgeteknologier – state of the art. 57-66. 22. oktober 2008.

/5/ Kristensen, A.H., P. Loll, K. Henriksen, L. Mortensen og P. Møldrup. Nedbrydning af oliestoffer i den umættede zone. Vand & Jord, nr. 1, 12-16, 2011.

/6/ Kristensen, A.H.. Soil Column Method for Examination of Volatile Organic Chemical Diffusion and Degradation in the Unsaturated Zone. M.Sc. specialeprojekt, Sektion for Miljøteknologi. Aalborg Universitet, 2006.

/7/ Kristensen, A.H., T.G. Poulsen, L. Mortensen og P. Moldrup. Variability of soil potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons in a heterogeneous subsurface. Journal of Hazardous Materials 179:573-580, 2010.

/8/ Leigh, M.B., L.Taylor og J.D. Neufeld. Clone Libraries of Ribosomal RNA Gene Sequences for Characterization of Bacterial and Fungal Communities. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, K. N. Timmis (ed.), DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_310, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

/9/ Muyzer G., E.C. Dewaal og A.G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gelelectrophoresis analysis of polymerase chain reactionamplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. Applied Environmental Microbiology. 59: 695–700, 1993.

/10/ Bordenave, S., M. Goñi-urriza, C. Vilette, S. Blanchard, P. Caumette og R. Duran. Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. Environmental Microbiology. 10:12, 3201-3211, 2008.

/11/ Kuntze, K., Y. Shinoda, H. Moutakki, M.J. McInerney, C. Vogt, H.H. Richnow og M. Boll. 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A

hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. Environmental Microbiology. 10(6):1547-56, 2008.

/12/ Kemiske stoffers opførsel i jord: Bind 2. Miljøprojekt nr. 20, 1996.

/13/ Andersen, L., K. Broholm og C. Grøn. Sammensætning af olie og benzin. Kemiske profiler til brug for risikovurdering. Miljøprojekt nr. 1220, 2008.

/14/ Green, S.J., M.B. Leigh og J.D. Neufeld. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Microbial Community Analysis. In K.N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_323, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

/15/ Hendrickx, B., W. Dejonghe, F. Faber, W. Boënne, L. Bastiaens, W. Verstrate, E.M. Top og D. Springael. PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites. FEMS Microbiol. Ecol. 55:262-273.

/16/ Atlas, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological reviews. 45(1):180-209, 1981.

/17/ Corseuil, H.X. og W.J. Weber Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils; Wat. Res. Vol. 28. No 6, 1415-1423, 1994.

/18/ Andersen, R.G. og J.S. Christensen. Intrinsic bioremediation of Hjørring gas plant site – Microcosm degradability study for benzene, phenols and MTBE; Final project M.Sc. Environmental Engineering; Aalborg University, 1998.

/19/ Kristensen, A.H. Controlling factors for natural attenuation of petroleum vapors in a layered subsurface. Ph.d.-afhandling fra Aalborg Universitet, 2010. (http://vbn.aau.dk/files/33972102/Controlling factors for natural attenuation of petroleum vapors in a layered subsurface.pdf)

/20/ Höhener, P., N. Dakhel, M. Christophersen, M. Broholm og P. Kjeldsen. Biodegradation of hydrocarbon vapors: Comparison of laboratory studies and field investigations in the vadose zone at the emplaced fuel source experiment Airbase Værløse, Denmark. Journal of Contaminant Hydrology, 88, 337-358, 2006.

/21/ DeVaull, G.E., R.A. Ettinger, J.P. Salanitro og J.B. Gustafson. Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes [BTEX] degradation in vadose zone soils during vapor transport: First-order rate constants. Proceedings of the petroleum hydracarbons and organic chemicals in ground water – prevention, detection, and remediation conference. ISSN: 1047-9023, 365-379, 1997.

/22/ Kaufmann, K., M. Christophersen, A. Buttler, H. Harms and P. Höhener. Microbial community response to petroleum hydrocarbon

contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Vaerlose, Denmark. Fems Microbiology Ecology 48, 387-399, 2004.

/23/ Jeon, C.O, W. Park, W.C. Ghiorse og E.L. Madsen. Polaromonas naphthalenivorans sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 93–97, 2004.

/24/ Kristensen, A.H., K. Henriksen, L. Mortensen, K.M. Scow og P. Moldrup. Soil physical constraints on intrinsic biodegradation of petroleum vapors in a layered subsurface. Vadose Zone Journal 9:137-147, 2010.

/25/ Loll, P. og P. Moldrup. Soil characterization and polluted soil assessment. Aalborg Universitet, 2000.