

Forureningsbekæmpelse med mikroorganismer

Ulrich Karlson
Niels Kroer
Pia A. Willumsen

Danmarks Miljøundersøgelser, 1996

TEMA-rapport fra DMU, 1996/5
Forureningsbekæmpelse med mikroorganismer

Forfattere: Ulrich Karlson, Niels Kroer, Pia A. Willumsen
Danmarks Miljøundersøgelser, Afdeling for Havmiljø og Mikrobiologi

Udgiver: Miljø- og Energiministeriet, Danmarks Miljøundersøgelser
Udgivelsesår: Maj 1996

Grafisk tilrettelægning: Anne van Acker og Karin Lykke Jensen
Fotos: DMU og Rambøll A/S

ISSN: 0909-8704
ISBN: 87-7772-247-7

Tryk: Christensens Fotosats
Oplag: 1.000 stk.
Sideantal: 32

Papirkvalitet: 100% dansk genbrugspapir, CyclusPrint
Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse.

Pris kr. 30,00 (incl. 25% moms, excl. forsendelse)
Klassesæt á 30 stk: 450 kr.
Abonnement (5 numre): 225 kr.
(Alle priser er incl. moms, excl. forsendelse)

Købes hos:

Danmarks Miljøundersøgelser
Afdeling for Havmiljø og Mikrobiologi

Frederiksborgvej 399, Postboks 358
DK-4000 Roskilde
Tlf. 46 30 12 00
Fax 46 30 11 14

Miljøbutikken
Information og bøger

Læderstræde 1
DK-1201 København K
Tlf. 33 92 76 92 (Information)
Tlf. 33 37 92 92 (Bøger)

Indledning	5
Hvad er bioremediering?	6
Hvad kan mikroorganismer nedbryde?	7
Forudsætninger for bioremediering	8
Anvendelser af bioremediering	11
Nedbrydning af pentaklorfenol (PCP)	
Nedbrydning af tjærestoffer	
Olienedbrydning i jord fra tankstationer	
Nedbrydning af triklorethylen (TCE) i grundvand	
Fordele og ulemper ved bioremediering	22
Hvad vil fremtiden bringe?	23
Litteratur	26
Danmarks Miljøundersøgelser	28



Indledning

Der er registreret næsten 3 000 kemikalieforurenede grunde i Danmark. Af disse er godt 700 forurenede med benzin og olie og ca. 100 med tjærestoffer. Tungmetalforureninger er registreret på omkring 200 grunde. Man regner med, at det samlede antal forurenede grunde, som skal registreres efter Affaldsdepotloven, vil komme op på 10 000 - 11 000. Mange af de forurenede områder er til fare for miljøet.

Et andet betydeligt problem er havneslam forurenede med kadmium, kviksølv, mineralolie, polyklorerede bifenyler (PCB'er), tributyltin, polyaromatiske kulbrinter eller dioxiner. Ifølge internationale aftaler er klapning (dumpning i havet) af havneslam ikke tilladt, hvis det indeholder væsentlige mængder af miljøfarlige stoffer. For Danmark betyder det, at ca. 400 000 tons havneslam hvert år skal deponeres på land.

Grundvand forurenede med pesticider (f.eks. atrazin) fra bl.a. landbrugets og haveejeres ukrudtsbekæmpelse er et tredje eksempel på, at "fortidens synder" fremover vil kræve, at betydelige økonomiske ressourcer afsættes til forureningsbekæmpelse.

I de seneste fem til ti år har man over hele verden (især i USA og Tyskland) forsket i at anvende mikroorganismer (bakterier og svampe) til at fjerne forureninger i miljøet - den såkaldte *bioremedieringsteknik*. Bioremediering anses som et alternativ til traditionelle rensningsmetoder, som f.eks. ventilation, ekstrahering (vaskning) eller forbrændning af jord. Som et eksempel på en forsøgsmæssig anvendelse af bioremediering kan nævnes oprydningssarbejdet efter oliespildet i 1989 i Prince William Sound i Alaska. Her forsøgte man på nogle af strandene at forbedre de tilstedeværende mikroorganismers levevilkår, så de blev bedre i stand til at nedbryde olien.

I denne temarapport gennemgås mulighederne for at anvende bioremediering til forureningsbekæmpelse.

Rapporten forklarer princippet i teknikken, beskriver fordele og ulemper sammenlignet med traditionelle oprensningsteknikker og giver eksempler på en række forsøgsanvendelser.

Hvad er bioremediering?

Bioremediering er baseret på, at mikroorganismer kan nedbryde en lang række forskellige kemiske stoffer og derfor i nogle tilfælde kan anvendes til rensning af kemikalieforurenede jord eller vand. Det er ikke en ny ide at bruge mikroorganismer i en teknologisk proces. Velkendte eksempler på traditionelle former for bioteknologi er fremstilling af øl, vin, yoghurt og kompostering af affald. Det nye ved bioremediering er, at mikroorganismene anvendes til at fjerne stoffer, som ikke naturligt hører hjemme i miljøet, de såkaldte *miljøfremmede stoffer*.

Ved bioremediering udnytter man mikroorganismernes metabolisme (stofskifte) til at nedbryde eller omdanne uønskede giftige stoffer til uskadelige stoffer, eller til stoffer som er nemmere at fjerne på traditionel vis. Nedbrydningen eller omdannelsen af kemikalierne foregår i de fleste tilfælde inde i mikroorganismernes celler og bliver gennemført ved hjælp af enzymer. Skematisk kan bioremedieringsprocessen beskrives på følgende måde:

Problemstof → Ønsket stof
<mikrobielle enzymer>

En forudsætning for at få mikroorganismene til at udføre nedbrydningsprocesserne er, at de får en fordel ud af at gennemføre dem. Mulige fordele for mikroorganismene kan være dannelse af energi til at vedligeholde cellerne, opnåelse af organiske kulstof forbindelser til vækst, eller fjernelse af en eventuel giftighed af problemstoffet. Fordi mikroorganismene stort set er specialister, dvs. hver type bakterie eller svamp kun kan nedbryde et meget begrænset antal problemstoffer, kan den tilpassede specialist potentielt vokse i den forurenede jord. Denne selektionsfordel udløber dog, når forureningen er fjernet.

Bioremediering kan enten udføres ved at tilsætte egnede bakterier til forureningen (den såkaldte *inokuleringsteknik*) eller ved at forbedre levevilkårene for de naturligt forekommende bakterier, som besidder de nødvendige egenskaber (*stimuleringsteknikken*). I et gram jord kan der findes lige så mange mikroorganismer som mennesker på jorden, så der er mange om at udføre arbejdet. De fleste af mikroorganismene er dog ikke relevante for bioremediering, idet kun et fåtal af dem har de rette enzymer.

Stof	Eksempler på forekomst
alkaner	benzin
benzen	benzin
toluen	benzin
ethylbenzen	benzin
xylene	benzin
polyaromatiske hydrocarboner	tjærestoffer
fenoler	kemisk industri
klorfenoler	træimprægnering
klorerede alifatiske forbindelser	opløsningsmidler
sæbestoffer	vaskemidler og rengøringsmidler
pesticider	landbrugskemikalier

Tabel 1. Eksempler på stoffer som i princippet kan nedbrydes af mikroorganismer.

Hvad kan mikroorganismer nedbryde?

Et stort antal forskellige kemiske stoffer kan nedbrydes mikrobielt (Tabel 1), og en lang række mikroorganismer, eksempelvis bakterier indenfor slægterne *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* og *Xanthobacter*, kan nedbryde en eller flere af disse forbindelser.

For nogle organiske forureninger, og for de fleste metalforureninger, findes der på nuværende tidspunkt ingen biologiske processer, som i praksis kan anvendes til oprensning (Tabel 2). Dette gælder også forsøg på laboratorieniveau. Stofferne omfatter klorerede dioxiner, dibenzofuraner og bifenyler samt højmolekylære PAH-forbindelser og methyl-*tert*-butylether.

Stof	Eksempler på forureninger
methyl- <i>tert</i> -butylether	spildevand spild af benzin grundvand
PCB'er	havneslam spild af hydraulikolie og transformatorolie
klorerede dioxiner	spild af træbeskyttelsesmidler (klorfenoler) havneslam slam fra rensningsanlæg
højmolekylære PAH'er	spild af tjære (gasværker) spild af træbeskyttelsesmiddel (creosot) havneslam
tungmetaller: Cr, As, Pb, Cd	havneslam spild af træbeskyttelsesmiddel gasværksgrunde
metalorganiske stoffer: tributyltin	havneslam

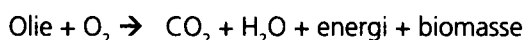
Tabel 2. Stoffer som p.t. ikke er nedbrydelige eller fjernbare ved bioremediering.

Forudsætninger for bioremediering

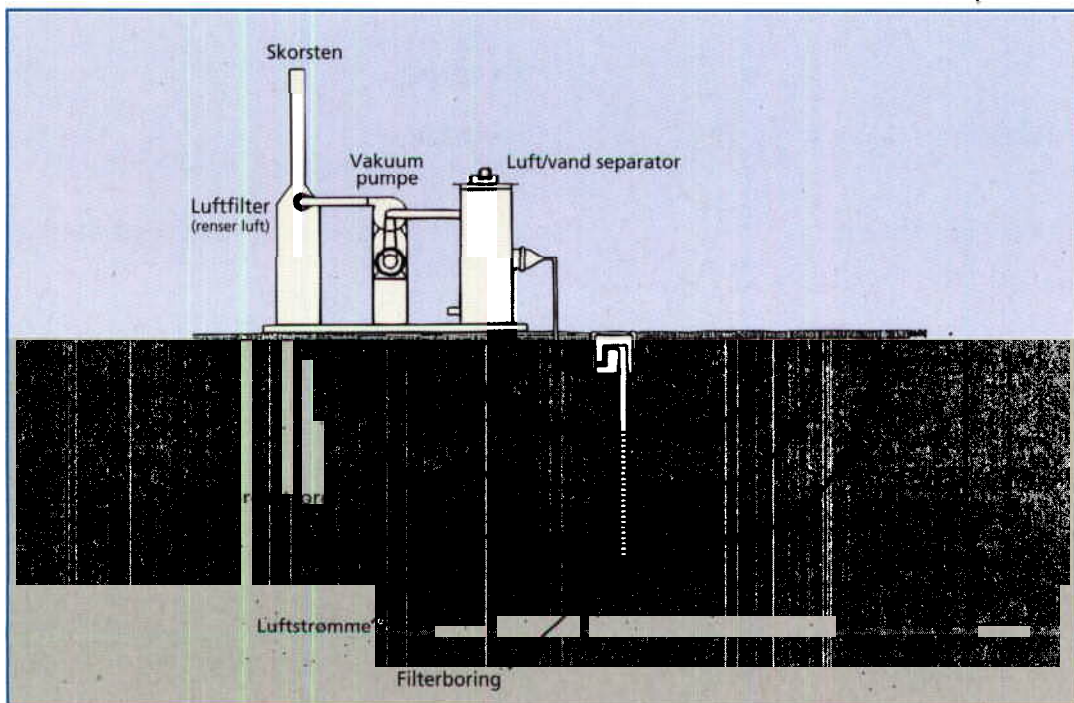
En række forudsætninger skal være opfyldt, for at bioremediering virker. Som nævnt ovenfor skal de rigtige mikroorganismer være tilstede, og disse skal samtidig have en fordel ud af at gennemføre processen. Udover disse biologiske faktorer er der en hel række fysiske/kemiske faktorer, som

har en indvirkning. Blandt disse kan nævnes iltforhold, mængden af uorganiske næringssalte (som f.eks. ammonium og fosfat), tilgængelighed og giftighed af de miljøfremmede stoffer samt temperatur- og pH forhold. I jord kan faktorer som vandindhold og jordtype også spille en rolle.

Kasse 1. Mineralisering af olie.



Bakterierne bruger olien som kilde til energi og organisk kulstof, dvs. at de lever og vokser på olien. Slutresultatet af processen er, at grundstofferne i olien bliver omdannet til kuldioxid (CO_2) og vand (H_2O), og at bakterierne muligvis har formeret sig. I dette eksempel udnytter mikroorganismene alle grundstofferne (kulstof og brint) i olien til dannelse af biologisk energi og cellemateriale (biomasse). Processen ligner stofskifteprocesserne i kroppen af mennesker og dyr. I bioremediering kaldes processen imidlertid for *mineralisering*, idet olien omdannes fuldstændigt til de uorganiske forbindelser, kuldioxid og vand, og eventuelt biomasse.



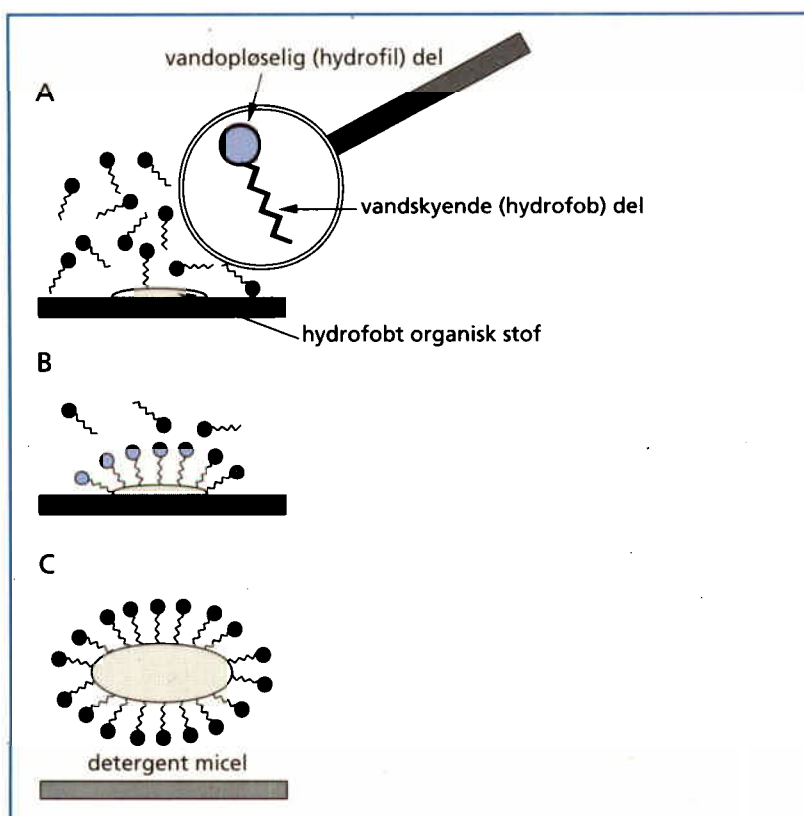
Figur 1. Princippet i bioventilering (omtegnet efter Oliebranchens Miljøpulje).

Olie kan nedbrydes af olienedbrydende bakterier. Som vist i Kasse 1 kræver nedbrydning af olie og andre organiske forureninger i de fleste tilfælde, at ilt er tilstede. Beluftning kan i praksis ske ved vending af jordmiler, ved tilførsel af luft (ved f.eks. indblæsning) eller tilførsel af ilt-dannende opløsninger. En meget praktiseret metode er den såkaldte *bioventilering*. Bioventilering er en mekanisk/biologisk proces, hvor flygtige kulbrinter trækkes ud af jordens porevolumen ved at påføre et vakuum til filterboringer, og hvor atmosfærisk luft samtidig trækkes ned i jorden til gavn for den naturlige biologiske nedbrydning af oliekomponenterne. Processen er beskrevet i Figur 1.

Oliespildet i Alaska er et eksempel på, at de biologiske processer behøver næringssalte (fosfor og ammonium) for at virke optimalt. Nedbrydningen af den opskyllede olie på strandene i Prince William Sound ved hjælp af de naturligt forekommende bakterier forløb således hurtigere, efter at næringssalte var blevet sprøjtet på de olieforurenede strande. Den øgede renseseffekt skyldtes sandsynligvis, at bakterierne uden tilsætning af næringssaltene manglede kvælstof og fosfor til opbygningen af nye cellebestanddele og derfor var mindre aktive.

To faktorer, som er bestemmende for, hvor hurtigt mange organiske forbindelser kan nedbrydes, er stoffernes opløselighed i vand og deres evne til at binde sig til jordmateriale. For at kunne optages af mikroorganismer er det nødvendigt, at forbindelserne overføres til eller i hvert fald kommer i kontakt med en vandig fase, eftersom mikroorganismernes hovedsagelig selv består af vand. Hvis dette ikke sker, vil nedbrydningen foregå meget langsomt, og man taler om, at stofferne har en ringe *biotilgængelighed*. Tjærestoffer, herunder polyaromatiske hydrocarboner (PAH-forbindelser), er eksempler på stærkt vandafvisende (*hydrofobe*) stoffer, som også binder sig til jordmateri-

ale. Biotilgængeligheden af disse forbindelser er derfor meget lav. I jord fra gamle gasværksgrunde er den største del af forureningen koncentreret i tjærekulper. Tilsætning af sæbestoffer (*detergenter*) kan imidlertid bevirke, at klumperne delvist opløses i den vandige fase, og at bundne PAH-forbindelser "vaskes" fri af jorden. Begge processer resulterer i en større biotilgængelighed og kan øge den mikrobielle nedbrydning. I Figur 2 er vist, hvordan detergenter kan øge den vandige opløselighed af tjærestoffer.

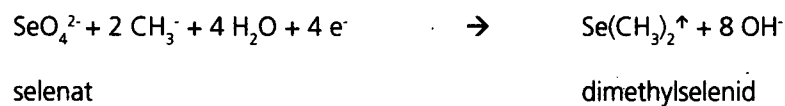


Figur 2. Forenklet skitse af detergentmolekyleres virkemåde ved opløsning af organiske forureninger fra f.eks. jordpartikler. Detergentmolekylerne orienterer deres hydrofobe ende mod den organiske forurening (A og B). Ved en vis koncentration af detergentmolekyler dannes miceller bestående af den organiske forurening inderst og detergentmolekylernes vandopløselige del yderst mod vandfasen; forureningen opløses i vandfasen (C).

Giftigheden eller *toksisiteten* af forureningen overfor mikroorganismene hører også til blandt de vigtigste faktorer for bioremedieringsprocessen. Ved en høj koncentration af de miljøfremmede stoffer er det kun de mikroorganismer, som er modstandsdygtige (*resistente*) overfor den pågældende forurening, som kan vokse. Ved omdannelsen af giftstoffet til et mindre giftigt stof får mikroorganismene normalt ikke energi ud af processen. Faktisk kræves der ofte energi og or-

ganisk kulstof, som mikroorganismene altså må skaffe et andet sted. Med hensyn til forureninger med stoffer som indeholder toksiske metaller, er omdannelse til flygtige forbindelser ofte den eneste mulighed for mikroorganismene til at slippe af med metallet. Mikrobiologisk omdannelse af organisk bundet kviksølv eller selen er eksempler på sådanne forbindelser, og hvor princippet er anvendeligt til bioremediering (se Kasse 2 og Kasse 5).

Kasse 2. Omdannelse af selen.



I selenforurenet jord eller vand findes selen i form af stoffet selenat. Mikrosvampe kan omdanne selenaten til dimethylselenid, der er flygtigt og fordamper. Selen er et svovllignende grundstof, som findes næsten overalt på jorden i små mængder. Selen er livsvigtigt for mennesker og dyr i lave koncentrationer, men i højere koncentrationer er det giftigt. Omdannelse af selenat til dimethylselenid koster energi, dvs. processen metabolisk set er kostbar for mikroorganismene. Fordelen for dem er imidlertid, at dimethylselenid i modsætning til selenat er ugiftigt. Den beskrevne mikrobielle process er brugt til jordrensning i USA (Figur 3). Selenforurenet jord er ikke et miljøproblem i Danmark.

Tilsætning af selen til gødning i Finland har dog nogle steder ført til høje selenkoncentrationer i jorden. Dimethylselenid er den gas, man kan lugte i nærheden af kålmarker, fordi stoffet også dannes i kålplanter og udskilles gennem bladene.

Anvendelser af bioremediering

Bioremediering er i flere europæiske lande og i Nordamerika en veletableret del af jordrensingsindustrien. Normalt er der tale om, at mindre jordmængder og bestemte forureningstyper bliver behandlet af specialiserede virksomheder, typisk efter opgravning, og i mange tilfælde efter transport til et behandlingsanlæg. Endnu er bioremediering i stor skala ikke udført ret mange steder. Jord fra en gammel pesticidfordelingsstation i North Dakota (USA) er blevet oprenset i fuld skala, og dybere liggende jord forurenede med olie/benzin er blevet oprenset med *in situ* metoder (uden opgravning) flere steder, især i USA. De fleste anvendelser af bioremediering har fundet sted som forforsøg til egentlige oprensninger i stor målestok.

Nedenfor er beskrevet en række eksempler på anvendelse af bioremediering til oprensning af forurenede jord eller vand.

Nedbrydning af pentaklorfenol (PCP)

Bioremediering af 3 500 tons jord fra en gammel træbeskyttelsesvirksomhed i Skalborg ved Ålborg blev gennemført i 1993. Jorden var forurenede med ca. 20 mg/kg af stoffet pentaklorfenol (PCP). PCP blev tidligere anvendt som træbeskyttelsesmiddel. Det er meget giftigt for alle levende organismer. For at opnå en hurtigere nedbrydningshastighed blev jorden inokuleret med en bakteriestamme, der er kendt for sin evne til at mineralisere PCP.



Figur 3. Tilsætning af appelsinskaller og zinkgødning til stimulering af de naturligt forekommende mikrosvampes omdannelse af selen.

Bakteriestammen hedder *Mycobacterium chlorophenicum*. Den blev tilsat med over 1 million bakterier pr. gram jord, dvs. at der i alt blev tilført over 10^{16} (10 000 000 000 000 000) bakterier til den forurenede jord. Bakterierne blev produceret af en virksomhed i Finland som 1 000 liter bakterievæske. Før opblanding med jorden blev bakterievæsken blandet sammen med skumgummi for at forbedre bakteriernes virkning og overlevelse (Figur 4). Selve opblandingen i jorden skete ved hjælp af en jordblandningsmaskine (Figur 5). Resultaterne viste, at bakterierne overlevede i ca. 2

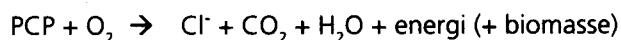
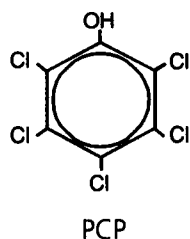
år, men at nedbrydningen af PCP var størst i starten af projektet (Figur 6).

I slutningen af 1995 var den største del af jorden (3 000 tons) rensat færdig, dvs. jorden indeholdt mindre end 0,1 mg PCP/kg jord. Princippet i bioremedieringsprocessen er vist i Kasse 3. Inokuleringsteknikken blev valgt, fordi indledende forsøg havde vist, at nedbrydningen foregik hurtigst med inokulerede bakterier, og fordi det er rapporteret, at naturligt forekommende bakterier kan danne kloranisoler, som også er giftige.

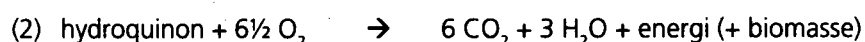
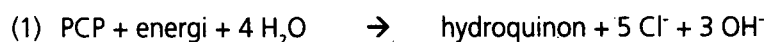


Figur 4.
Bakterievæske indeholdende *M. chlorophenicum* bliver blandet med skumgummi og nærings-salte.

Kasse 3. Mineralisering af pentaklorfenol (PCP).



Bakterierne, som blev brugt til oprensningen af PCP på Skalborg jorden, kan mineralisere PCP til vand, kuldioxid og klorioner. Kun nogle få bakterietyper kan gennemføre denne omsætning, der i virkeligheden foregår i to trin:

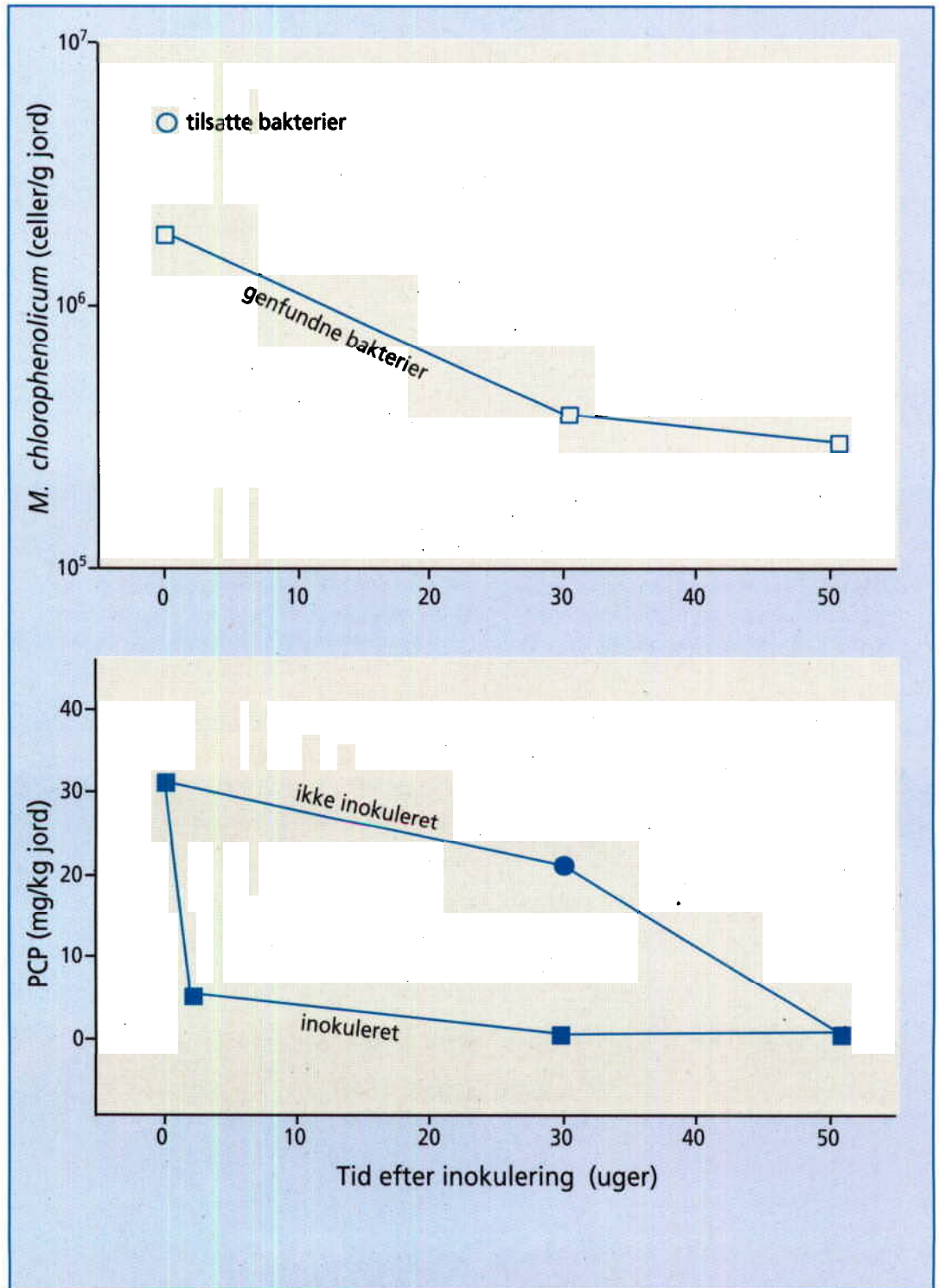


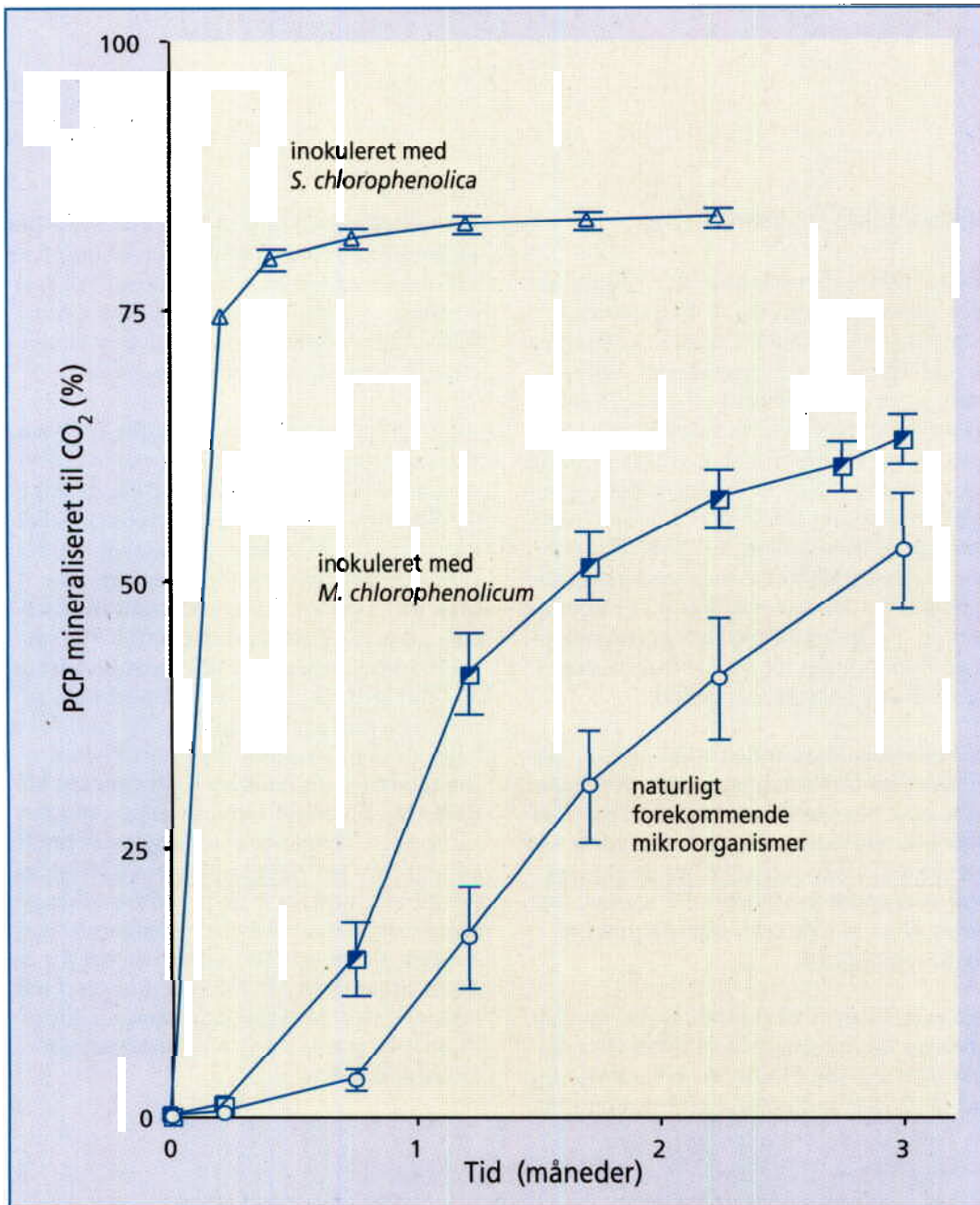
Ved nedbrydningsprocessen bruger bakterierne først energi til at fjerne kloratomerne fra PCP-molekylet. De fem kloratomer på hvert PCP-molekyle fjernes ved hjælp af specielle deklorinaseenzymmer. Kloridionerne udskilles til den omgivende jord, hvor der dannes NaCl (kogsalt). Efter at kloratomerne er fjernet fra PCP-molekylet, nedbryder bakterierne hydroquinon på samme måde, som andre bakterier mineraliserer olie (Kasse 1). Gennem dette andet trin får bakterierne mere energi, end de investerede i det første trin, så i alt er der en lille positiv energibalance for bakterierne. Ydermere er de sluppet af med det giftige PCP.



Figur 5. Bakterier, næringssalte og skumgummi bliver blandet med den PCP-forurenet jord i en jordblandingsmaskine.

Figur 6. Overlevelse af *M. chlorophenolicum* i PCP-forurenet jord og rensningseffekt af bakterierne.





Figur 7. Effekt af inokulering med 2 forskellige PCP-nedbrydende bakterier i forhold til de naturligt forekommende mikroorganismer (laboratorieforsøg).

Efter at rensningen af jorden var igangsat, viste laboratorieundersøgelser hos Danmarks Miljøundersøgelser (DMU), at man ved brug af en anden type bakterie kunne have op-

nået en hurtigere mineralisering af PCP (Figur 7). Dette illustrerer, at man af og til af tidsmæssige årsager er nødt til at løse et problem uden tilstrækkelige forundersøgelser.

Nedbrydning af tjærestoffer

Enhver større dansk by havde tidligere sin egen produktion af bygas. Bygassen blev fremstillet ud fra kul (se Kasse 4). Mange af de nedlagte gasværksgrunde er i dag centralt og attraktivt placeret i byerne. I 1992 blev der igangsat seks forsøgsprojekter til oprensning af kommunale gasværksgrunde. I et af disse projekter (Frederiksberg gasværksgrund) har DMU sammen med ingeniørfirmaet Rambøll A/S, Frederiksberg Kommune og Miljøstyrelsen undersøgt muligheden for at rense ved hjælp af bioremediering. Projektet bestod dels af undersøgelser i laboratoriet og dels af et feltforsøg i stor skala på gasværksgrunden

I indledende laboratorieundersøgelser blev de naturligt forekommende mikroorganismers evne til at nedbryde udvalgte tjæreforbindelser (phenanthren, anthracen, fluoranthren, pyren og benzo(a)pyren) undersøgt. Den forurenede jord indeholdt samme størrelsesorden af bakterier som en god næringsrig muldjord.

Bakteriernes evne til at mineralisere to af de udvalgte tjæreforbindelser - anthracen og pyren (se tegning i Kasse 4) - blev undersøgt ved at tilsætte radioaktivt anthracen og py-

ren til jordprøver og derefter bestemme dannelsen af radioaktivt kuldioxid. I Figur 8 er vist, hvordan pyren og anthracen blev mineraliseret. Som det ses på figuren, kunne bakterierne mineralisere op til 45% af den tilsatte mængde anthracen og pyren.

Andre forsøg viste, at også stoffet phenanthren (se tegning i Kasse 4) kunne nedbrydes af bakterierne i jorden. Det var derfor sandsynligt, at mikroorganismene i jorden var i stand til at nedbryde disse tre PAH-forbindelser såvel som andre tjærekompponenter i jorden. Temperaturen indflydelse på nedbrydningsraten af de udvalgte PAH-forbindelser og effekten af tilsætning af detergent blev undersøgt i modelforsøg med 5 kg gasværksjord (Figur 9). Antallet af bakterier og koncentrationen af PAH-forbindelserne i jorden blev fulgt over ca. 11 måneder. Forsøget viste, at uanset temperatur eller tilsætning af detergenter blev fra 64% til 71% af PAH'erne mineraliseret. Den udeblivende effekt af detergenttilsætningen kunne skyldes, at mikroorganismene brugte detergenten som fødekilde i stedet for de svært tilgængelige PAH-forbindelser. I feltforsøget blev detergentopløsningen derfor tilsat flere gange i små portioner gennem forsøgsperioden.

Ved feltforsøget blev dele af jorden på gasværksgrunden gravet op og lagt i miler á 30 m³ både på den gamle gasbeholderplade, hvor jorden blev udsat for vind og vejr, og i et telt (Figur 10). Det blev undersøgt, om vending af jorden, tilsætning af kompost, træflis og detergent havde en effekt på nedbrydningen af tjærestofferne. Forureningen var meget inhomogent fordelt i jorden (klumper), hvilket er et almindeligt problem for tjæreforurenet jord.

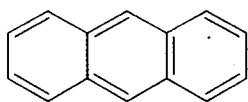
Tjæreklumperne betød, at det var svært at konkludere om den ene behandling var bedre end den anden på grund af stor variation i analyseresultaterne. Sideløbende undersøgelser viste imidlertid, at tilsætning af kompost og detergent samt vending af jordbunkerne havde en større effekt på aktiviteten af de phenanthren-nedbrydende bakterier end tilsætning af træflis. Forsøg på at rense gamle gasværksgrunde ved anvendelse af biologiske metoder har

Kasse 4. Tjærestoffer.

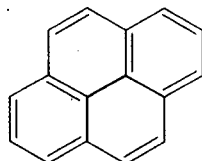
Tjærestoffer er restprodukter fra bygasproduktion. De findes ofte i store mængder på de gamle gasværksgrunde. Tjærestofferne indeholder bl.a. PAH-forbindelser bestående af to eller flere sammensatte benzenringe. Mange af disse organiske forbindelser er sundhedsskadelige og kræftfremkaldende og er derfor uønskede i miljøet.

Man har fundet mikroorganismer i de tjæreforurene jorde, som er i stand til at nedbryde PAH-forbindelser bestående af op til 4 ringe. PAH'er bestående af flere end 4 sammensatte ringe kan delvist nedbrydes, men dette kræver ofte et samarbejde mellem flere typer mikroorganismer før forbindelserne kan mineraliseres fuldstændigt til kuldioxid og vand.

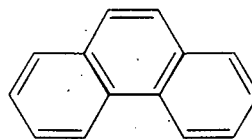
Tjærestoffer er meget hydrofobe (vandafvisende) og derfor kun meget lidt opløselige i vand. Da de samtidig bindes til materiale i jorden, er det ofte svært for mikroorganismene at nedbryde dem.



Anthracen

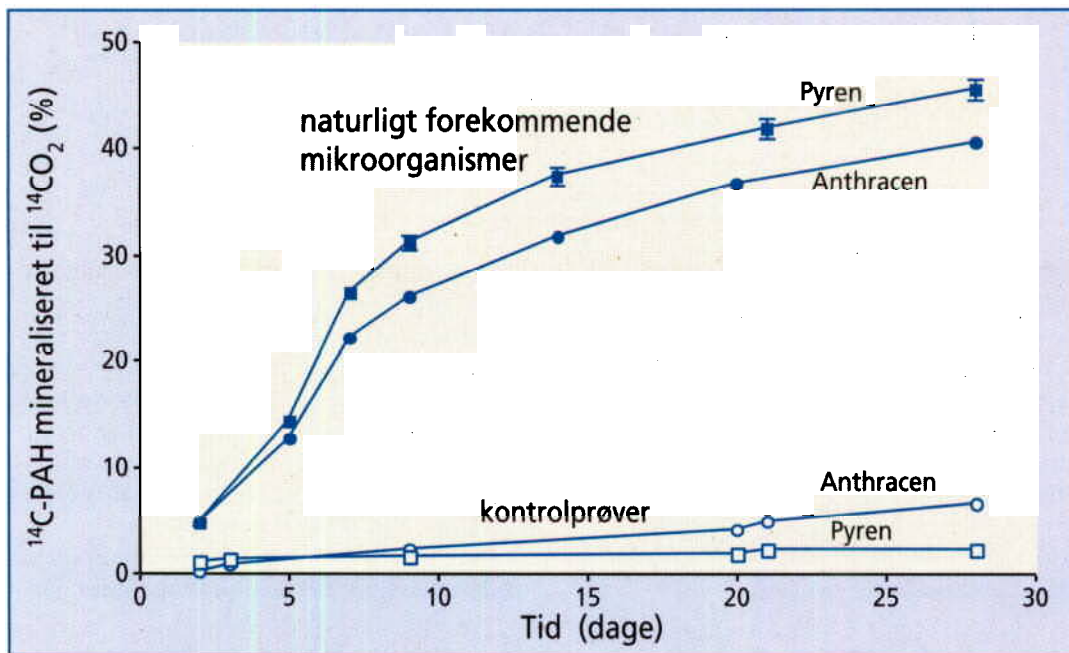


Pyren

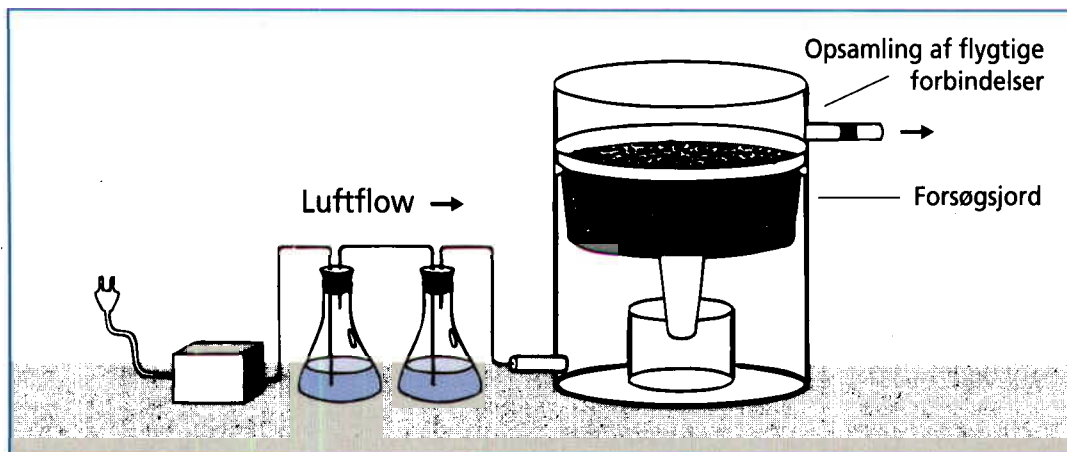


Phenanthren

Figur 8. Akkumuleret udvikling af radioaktivt mærket kuldioxid i % af tilsat ¹⁴C-Pyren og ¹⁴C-Anthracen i jord fra Frederiksberg gasværksgrund (laboratorieforsøg). Værdierne repræsenterer gennemsnit og spredning af tre replikater. Kontrolprøverne var steriliseret ved strålebehandling.



Figur 9. Forsøgsopstilling til undersøgelse af temperaturens indflydelse og effekten af tilsætning af detergent på nedbrydning af PAH i jord fra Frederiksberg gasværksgrund.



været udført andre steder i verden. F.eks. har man i Solingen i Tyskland lavet forsøg som viste, at tilsætning af bykompost til den forurenede jord havde en positiv effekt på fjernelsen af PAH-forbindelserne. Tilsætning af bakterier eller hyppig vending (iltning) af jorden havde derimod ingen virkning. Effekten af den tilsatte kompost kan forklares ved en såkaldt humificeringspro-

ces, hvor PAH-forbindelserne blev indbygget i jordens humusstoffer og derefter ikke kunne skelnes fra almindelig humus ved standard jordanalyser. Mikrobiologerne er nu i gang med at undersøge, om en sådan humificering er et miljømæssig acceptabelt alternativ til den mikrobielle mineralisering af PAH-forbindelser.



Figur 10. Feltforsøg på Frederiksberg Gasværksgrund. Jordmiler på den gamle gasbeholderplade og i et felt.

Olienedbrydning i jord fra tankstationer

I Danmark er rensningen af forurenet jord fra tankstationer koordineret af Oliebranchens Miljøpulje (OM). Finansieringen sker bl.a. gennem bidrag fra de olieselskaber, der foretager engrossalg af benzin på det danske marked. Oprensningerne sker ved anvendelse af etablerede jordrensemetoder såvel som ved afprøvning af nye teknikker.

De såkaldte *in situ* teknikker, hvor det forurenede område renses uden opgravning og flytning af forureningen, har høj prioritet. Ved disse teknikker stimuleres bakterierne i jorden eller grundvandet til at nedbryde de pågældende forureninger bl.a. gennem tilførsel af ilt (den tidligere omtalte bioventileringsmetode, Figur 1). Derudover fjernes de organiske forureninger, som er opløst i vandfasen, ved udblæsning, hvorved de overføres til gasform og efterfølgende opsamles på filtre af aktivt kul. Hvor opgravning af forureningen er nødvendig, bliver jorden transporteret til jordrensningsfirmaer, som renses jorden biologisk ved udlægning i miler. Bakterierne i den forurenede jord stimuleres til at nedbryde forureningen ved tilsætning af næringssalte og vending af jordmilerne. Siden oprettelsen af OM i starten af 1993 er i alt 300 projekter med rensning af benzinformurenede grunde blevet afsluttet. Der er i øjeblikket 160 projekter i gang. I 20 af disse projekter anvendes bioventileringsmetoden, mens udblæsning benyttes i 2 tilfælde. De resterende oprensninger foretages ved opgravning af forureningen og efterfølgende biologisk behandling ved mileteknikken.

I Finland har man forsøgt at oprense jord fra tankstationer forurenet med smøreolie. Jorden blev homogeniseret, blandet med barkflis og arrangeret i kompostmiler. Nærings-salte blev tilsat, og pH-værdien reguleret til pH 7 ved tilsætning af kalk. I to miler blev der tilsat kommercielle bakteriepræparater. Kompostmilerene blev vendt og iltet med en blandemaskine med to til fire ugers mellemrum i løbet af sommeren. Olieindholdet blev hver gang analyseret og den mikrobielle aktivitet bestemt. Nedbrydningsraten var størst i de første par måneder. Over hele perioden (fem måneder) blev olieindholdet reduceret fra 2 400 til 700 mg pr. kg jord. Jorden er efter de danske acceptkriterier for biologisk renses olieforurenet jord (50 mg hydrocarboner pr. kg jord) ikke tilfredsstillende renses. En optimering af nedbrydningsprocessen er derfor nødvendig. De tilsatte mikroorganismer havde ingen effekt på nedbrydningen, hvorimod næringssaltene havde en accelererende effekt i starten. Man arbejder videre på at reducere koncentrationen til under 100 mg pr. kg jord.

Nedbrydning af triklorethylen (TCE) i grundvand

På en flybase i Californien var grundvandet forurenet med triklorethylen (TCE). TCE er et opløsningsmiddel, og på flybasen blev det brugt til at renses det militære udstyr. Mikrobiologiske undersøgelser viste, at der fandtes bakterier i grundvandet, som var i stand til at nedbryde TCE'en, men kun gennem en såkaldt *co-metabolisk proces*. Det betød, at bakterierne ikke primært mineraliserede TCE, men at deres enzymer tilfældigvis kun-

ne omdanne det til TCE-epoxid under nedbrydning af et bestemt andet stof. Det dannede TCE-epoxid blev nedbrudt spontant til stoffer, som efterfølgende kunne mineraliseres fuldstændigt til kuldioxid og vand af andre mikroorganismer i grundvandsmagasinet. Det bestemte andet stof, som bakterierne krævede for at co-metabolismen kunne komme i gang, var fenol. Fenol er ligesom TCE giftigt. Det krævede derfor store overvejelser om det forsvarlige i at tilsætte et nyt giftstof til grundvandet for at fjerne TCE'en.

De californiske myndigheder gav endelig tilladelse til at gennemføre et forsøg i stor skala, og heldigvis blev forsøget en succes. Fenolen, som blev ført ned til grundvandet sammen med ilt, blev mineraliseret til under detektionsgrænsen ($25 \mu\text{g}/\text{l}$), mens TCE-koncentrationen blev reduceret til under 15% af udgangsværdien ($500 \mu\text{g}/\text{l}$). Mikrobiologerne er nu i gang med at gensplejse bakterier, som er i stand til at nedbryde TCE uden tilførsel af fenol.

Fordele og ulemper ved bioremediering

Biologiske behandlingsmetoder kan til sammenligning med traditionelle fysisk-kemiske teknikker tilbyde en række økonomiske og miljømæssige fordele. Omvendt er der også en række ulemper ved bioremedieringsteknikkerne. Det er derfor nødvendigt at opveje fordele og ulemper, før der tages stilling til hvilken oprensningssprocedur, der er mest hensigtsmæssig i det enkelte tilfælde.

Ved biologisk nedbrydning under optimale forhold omdannes organiske forbindelser til ugiftige stoffer som kuldioxid, vand og f.eks. klorid. Der efterlades ingen affaldsprodukter i form af aske og slagger, som ved forbrænding. En jord behandlet biologisk er efter behandlingen stadig næringsrig og biologisk aktiv og kan genbruges. Afbrændt jord eller kemisk behandlet jord er derimod biologisk død og kan kun anvendes til opfyldning på lossepladser eller som vejunderlag.

Transport af jord er dyr og belastende for miljøet. En af fordelene ved bioremediering er, at man kan rense jorden på stedet. Ved anvendelse af *in situ* metoder, hvor jorden ikke opgraves, er det desuden muligt at foretage oprensninger under eksisterende bygninger. Derudover kræver biologiske metoder sjældent store investeringsomkostninger eller et højt energiforbrug. I 1993 kostede det 150-350 kr. pr. ton for bioremediering, 800-1 200 kr. for kemisk ekstraktion eller vaskning, og 700-1 000 kr. for afbrænding.

Bioremediering er især anvendelig til rensning af letsandede jorde forurenede med lettilgængelige og letnedbrydelige stoffer (Tabel 1). Derimod er de biologiske renseteknikker ikke velegnede til rensning af jord

med et stort lerindhold eller jord forurenede med mange tungmetallforbindelser eller sværtnedbrydelige organiske stoffer. Rensning af jord ved hjælp af mikroorganismer er endvidere afhængig af klimaforhold og er ofte tidskrævende. Tidsrammen for et bioremedieringsprojekt er således generelt længere end ved oprensning med traditionelle metoder.

En effektiv mikrobiel mineralisering af et givet stof kræver som regel, at stoffet findes i en vis minimumskoncentration. I praksis kan det derfor være svært at opnå så lave restkoncentrationer af stoffet, at vedtagne grænseværdier kan opfyldes. I eksemplet med nedbrydning af PCP (se side 12) faldt PCP-koncentrationen f.eks. hurtigt til ca. 0,5 mg/kg, mens nedbrydningen kun langsomt reducerede koncentrationen til grænseværdien (0,1 mg/kg).

Et alvorligt problem ved bioremediering er, at flygtige stoffer, i stedet for at blive nedbrudt af mikroorganismene, kan fordampe til atmosfæren, når jorden enten beluftes eller vendes. Mange organiske forureninger, som benzinkomponenterne benzen, toluen, ethylbenzen og xylen, er flygtige. Undersøgelser har vist, at en stor del af disse stoffer kan forsvinde fra jorden ved fordampning.

Der kan desuden være situationer, hvor de naturligt forekommende mikroorganismer danner giftige mellem- eller slutprodukter under nedbrydningen af forureningen. F.eks. kan klorfenoler omdannes til kloranisoler, som fordamper og dermed forurener luften. Inokulering med klorfenolnedbrydende bakterier kan imidlertid sikre, at en fuldstændig nedbrydning til kuldioxid finder sted (se Kasse 3).

Hvad vil fremtiden bringe?

Over hele verden forskes der på livet løs i at forbedre bioremedieringsteknologien. Man har erkendt, at uden en tilbundsående forskningsindsats vil teknikken næppe kunne få en generel udbredelse. Det er nødvendigt at have et grundigt kendskab til nedbrydermikroorganismernes økologi, således at helt basale spørgsmål vedrørende deres vækstkaraktistika, deres overlevelse i jord eller vand og deres interaktioner med andre typer af mikroorganismer kan besvares. Endvidere er betydningen af co-metabolisme og biotilgængelighed og en klarlægning af de forskellige nedbrydningsmekanismer vigtige forskningsområder.

Der findes i dag en række kommercielle bakteriepræparater på markedet. Disse bliver ofte beskrevet som "vidundermidler", men endnu er der ingen konkrete beviser på, at de virker i praksis, og i mange tilfælde er de ovennævnte spørgsmål slet ikke undersøgt til bunds.

Forskningen ved Danmarks Miljøundersøgelser tager sigte på at undersøge de ovennævnte spørgsmål for derigennem at bidrage til udviklingen af nye bioremedieringsteknikker og kunne rådgive myndigheder og private virksomheder. Deltagelse i egentligt oprydningssarbejde indgår kun, hvis oprydningen kan anvendes til at belyse vigtige spørgsmål af forskningsmæssig karakter. Det er endvidere DMU's opgave at undersøge, om udsætning af (gensplejse) mikroorganismer i forbindelse med bioremediering kan have uforudsete og uønskede effekter på miljøet.

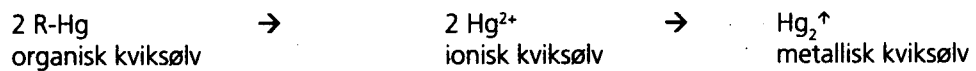
Et problem ved inokuleringsteknikken, altså den teknik hvor man tilfører mikroorganismer, er, at mikroorganismene fra laboratoriet sjældent overlever særlig længe i natur-

en. Chancen for at forureningen nedbrydes af de tilsatte mikroorganismer er derfor meget ringe. Til afklaring af dette problem arbejder DMU's forskere med to løsningsmodeller.

Den ene model går ud på at tilføre de bakterier, som allerede findes i naturen, nogle nye egenskaber, så de bedre bliver i stand til at nedbryde forureningen. Eksempelvis arbejder man i en række forsøg med at gøre naturligt forekommende bakterier i stand til at omdanne organisk kviksølv til kviksølvioner. Fra naturens hånd er mange bakterier udstyret med evnen til at omdanne kviksølvioner til frit kviksølv. Hvis disse bakterier får tilført det nye arveanlæg, kan de omdanne organisk kviksølv til frit kviksølv, der så fordampes og kan opsamles på et filter af aktivt kul (se Kasse 5). Disse undersøgelser foregår i samarbejde med Københavns Universitet og den amerikanske miljøstyrelse (Environmental Protection Agency). Teknikken med at forbedre jordens egne bakterier er stadig på forsøgsstadiet, og det vil tage adskillige år, før de første anvendelser vil kunne finde sted.

Den anden løsningsmodel har knap så lange udsigter. Den går ud på at forbedre de udsatte bakteriers levevilkår ved hjælp af planter. I jorden lige omkring planterødder (*rhizosfæren*) findes flere mikroorganismer end i den omgivende jord. Dette skyldes, at planterødderne mister eller udskiller kulhydrater og proteinstoffer til jorden - de såkaldte *rodeksudater*. Bakterierne benytter rodeksudaterne som næringsstoffer og kan på grund af de gunstige vækstforhold vokse sig til en stor tæthed. Ved at inokulere planterødder med nedbryderbakterier kan man opnå, at de voksende planterødder holder bakterierne aktive og samtidig fordeler

Kasse 5. Omdannelse af kviksølv.



Organisk bundet kviksølv eller kviksølvioner kan omdannes til frit metallisk kviksølv af en række bakterier og mikrosvampe. Organisk og ionisk kviksølv er let tilgængeligt for levende væsener. Metallisk kviksølv er mindre tilgængeligt og derfor mindre giftigt. Derudover fordampes det metalliske kviksølv. Mange mikroorganismer danner derfor metallisk kviksølv, fordi produktet fjernes fra deres celler ved fordampning. Processen kan i princippet bruges til fjernelse af kviksølv fra forurenede jord eller vand ved udblæsning af det bakterielt dannede metalliske kviksølv og efterfølgende opsamling på filtre af aktivt kul.

dem i jorden. Endvidere sikrer planternes vandforbrug, at det vand, som suges gennem jorden til rødderne, transporterer forureningen hen til nedbryderbakterierne.

Rhizosfæren bliver dermed en slags solenergidrevet bioreaktor (Figur 11). Teknologien er for øjeblikket i afprøvningsfasen hos DMU og Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole og er beskyttet gennem en patentansøgning. Rodzoneteknologien kan i princippet bruges til alle former af organiske jordforureninger, også selvom de er ikke vandopløselige. Rodzonebakterier kan ikke nedbryde tungmetaller, men planterne kan muligvis opkoncentrere metallerne i de overjordiske plantedele.

Et andet vigtigt område, som indgår i DMU's forskningsprogram, er undersøgelser over, hvorledes biotilgængeligheden af organiske forureninger kan øges. Ved at tilsætte detergenter kan man frigøre forureningen fra jorden og øge vandopløseligheden. Men det er ikke nødvendigvis ensbetydende med, at den mikrobielle mineralisering af de hydrofobe organiske forbindelser også øges. Der arbejdes derfor på at belyse, hvorledes virkningen af detergenter er baseret, samt hvorledes bakteriernes overfladeegenskaber påvirker optagelsen af de hydrofobe forbindelser.



Figur 11.
Forsøgsopstilling til
undersøgelse af
jordrensning med
inokulerede plante-
rødder.

Litteratur med direkte tilknytning til temarapportens indhold

Frankenberger, Jr. W.T. & Karlson, U. (1995). Volatilization of selenium from a dewatered seleniferous sediment: a field study. *J. Industr. Microbiol.* 14:226-232.

Frankenberger, Jr. W.T. & Karlson, U. (1989). Selenium Detoxification. Patent number 4,861,482. United States Patent Office.

Hopkins, G.D., Munakata, J., Semprini, L. & McCarty, P.L. (1993). Trichloroethylene concentration effects on pilot-, field scale, in situ groundwater bioremediation by phenol-oxidizing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2542-2547.

Karlson, U., Uotila, J.S. & Jacobsen, C.S. (1995). Anvendelse af planter med inokulerede mikroorganismer til jordrensning. Patentdirektoratet. Ansøgn. Nr. 0088/95.

Karlson, U., Miethling, R., Schu, K., Hansen, S. S. & Uotila, J. (1995). Biodegradation of PCP in soil. In: R.E. Hinchey, R.E. Hoeppe, and D.B. Anderson (Eds.), *Bioremediation of Recalcitrant Organics*. Battelle Press, Columbus, OH, *Bioremed. Ser.* 3(7): 83-92.

Karlson, U. & Frankenberger, Jr. W.T. (1993). Biological alkylation of selenium and tellurium. In: H. Sigel and A. Sigel (eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 29, *Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives*. Marcel Dekker, New York, p. 185-227.

Kästner, M., Mahro, B. & Wienberg, R. (1993). *Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe*. Economica Verlag, Bonn.

Miljøstyrelsen (1992). *Acceptkriterier for mikrobiologisk rensning jord*. Vejledning fra Miljøstyrelsen. Nr. 8.

Puustinen, J., Jørgensen, K.S., Strandberg, T. & Suortti, A.-M. (1995). *Bioremediation of oil contaminated soil from service stations - evaluation of biological treatment*. National Board of Waters and the Environment, Helsinki, Finland. *Publications of the Water and Environment Administration - series A 208*.

Steilen, N., Heinkele, T. & Reineke, W. (1994). *Feldversuche zur mikrobiologischen Sanierung eines PAK-belasteten Bodens (ehemaliger Gaswerkstandort) in Solingen-Ohligs*. Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, *Materialien zur Ermittlung und Sanierung von Altlasten*, Band 10, Düsseldorf.

U.S. Environmental Protection Agency (1990). *Bioremediation in the field*. Publication number EPA/540/2-90/004, Cincinnati, Ohio.

Willumsen, P.A. & Karlson, U. (1995). *Biologisk nedbrydning af PAH i jord fra Frederiksberg Gasværksgrund*. Laboratoriestudie, fase 2. Danmarks Miljøundersøgelser, 101 sider. Faglig rapport fra DMU, nr. 127. Roskilde, Danmark.

Litteratur om beslægtede emner

Alexander, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, California.

Aamand, J., Jensen, B.K. & Kvistgaard, M. (1995). Bioremediation of Contaminated Soil: Development and Application of Technologies. Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, Nr. 4. Miljø- og Energiministeriet, Miljøstyrelsen, København.

Frankenberger, Jr. W.T. & Karlson, U. (1994). Campaigning for bioremediation. Chemtech 24: 45-51.

MiljøDanmark (December 1992). Årgang 6, nr. 6.

Norris, R.D., Hinchee, R.E., Brown, R., McCarthy, P.L. & Semprini, L. (1993). In-situ bioremediation of groundwater and geological material: A review of technologies. Publ. no. EPA/600/R-93/124. U.S. Environmental Protection Agency, Ada, Oklahoma.

Danmarks Miljøundersøgelser

Danmarks Miljøundersøgelser - DMU - er en forskningsinstitution i Miljø- og Energiministeriet. DMU's opgaver omfatter forskning, overvågning og faglig rådgivning indenfor natur og miljø.

Henvendelser kan rettes til:

Danmarks Miljøundersøgelser
Postboks 358
Frederiksborgvej 399
4000 Roskilde
Tlf. 46 30 12 00
Fax 46 30 11 14

*Direktion og Sekretariat
Forsknings- og Udviklingssekretariat
Afd. for Atmosfærisk Miljø
Afd. for Havmiljø og Mikrobiologi
Afd. for Miljøkemi
Afd. for Systemanalyse*

Danmarks Miljøundersøgelser
Postboks 314
Vejlssøvej 25
8600 Silkeborg
Tlf. 89 20 14 00
Fax 89 20 14 14

*Afd. for Sø- og Fjordøkologi
Afd. for Terrestrisk Økologi
Afd. for Vandløbsøkologi*

Danmarks Miljøundersøgelser
Grenåvej 12, Kalø
8410 Rønne
Tlf. 89 20 14 00
Fax 89 20 15 14

*Afd. for Kystzoneøkologi
Afd. for Landskabsøkologi*

Danmarks Miljøundersøgelser
Tagensvej 135, 4.
2200 København N
Tlf. 35 82 14 15
Fax 35 82 14 20

Afd. for Arktisk Miljø

Publikationer:

DMU udgiver faglige rapporter, tekniske anvisninger, temarapporter, særtryk af videnskabelige og faglige artikler samt årsberetninger.

I årsberetningen findes en oversigt over det pågældende års publikationer. Årsberetning samt en opdateret oversigt over årets publikationer fås ved henvendelse til telefon: 46 30 12 00.

Tidligere udgivelser i serien TEMA-rapporter fra DMU

Nr. 1994/1: Kvælstoftilførsel til Limfjorden

Nr. 1994/2: Luftforurening i danske byer

Nr. 1995/3: Ozon som luftforurening

Nr. 1996/4: Tungmetaller i danske jorder



