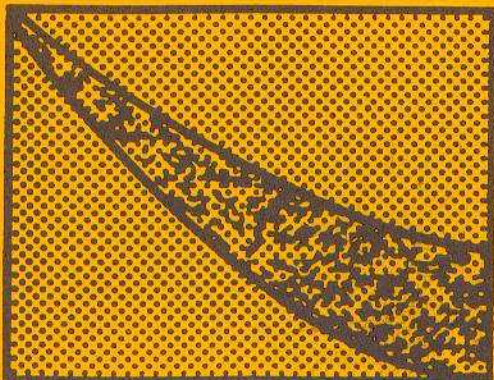
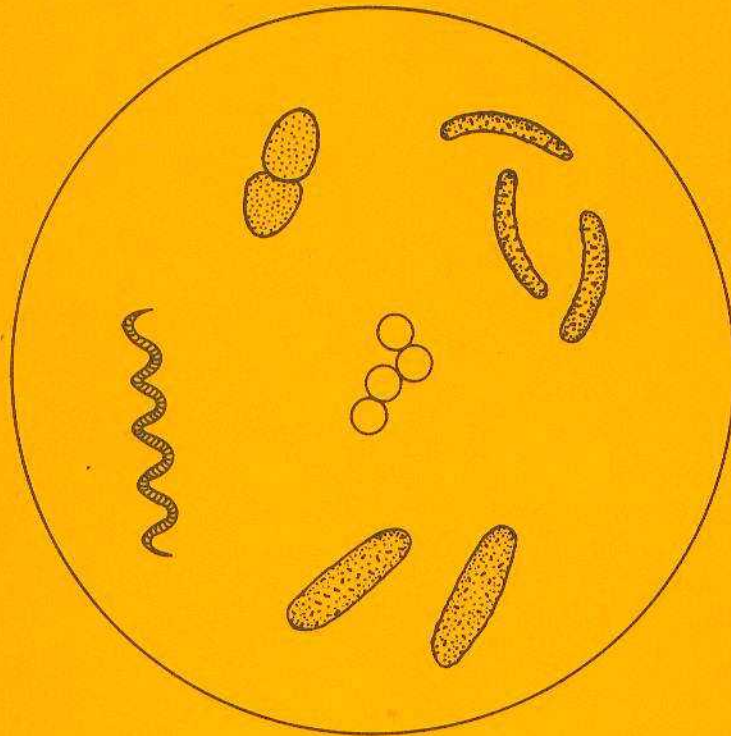


628.472
B25



GRUNDVANDZONENS MIKROBIOLOGI

RAPPORT P6-1

JANUAR 1988

LOSSEPLADSPROJEKTET

OM LOSSEPLADSPROJEKTET

I Danmark findes mere end 3000 gamle kemikalieaffaldsdepoter og lossepladser, hvoraf mange udgør en trussel mod grundvandet og dermed også landets vandforsyning og ferske vande. Det offentlige bruger i disse år flere hundrede millioner kroner på at kortlægge og rydde op efter tidligere årtiers uhensigtsmæssige måde at bortskaffe affald.

Forsknings- og udviklingsprogrammet "Retablering af grundvand forurenet af perkolat fra gamle lossepladser", oftest omtalt som LOSSEPLADSPROJEKTET, har til formål at dokumentere og udvikle metoder til kortlægning, vurdering og afværgning af grundvandsforurening ved gamle lossepladser. Programmet omfatter 3 delprogrammer:

o Et forskningsprogram, PILOTLOSSEPLADSPROJEKTET, med fokus på en konkret losseplads omfattende 32 enkeltprojekter og 4 integrationsprojekter inden for de fire områder: hydrogeologi, forureningskemi, matematiske modeller og afværgeteknik.

o Et udviklingsprogram, AFVÆRGE-UDVIKLINGSPROJEKTER, omfattende udviklingsprojekter på en række konkrete lossepladser, hvor der allerede i medfør af Depotloven er igangsat afværgning. Udviklingsprojekterne har især til formål at undersøge og demonstrere alternative afværgeteknikker.

o Et informationsprogram, ERFARINGSUDVEKSLINGSPROJEKTET, der via informationsbreve, møder, kurser, ekskursioner og udredningsrapporter søger at fremme informationsudvekslingen mellem forskere, rådgivere og administratorer, således at de indhøstede erfaringer udnyttes bedst muligt.

LOSSEPLADSPROJEKTET omfatter, vedrørende forskningsprogrammet, 8 danske institutioner:

- o Laboratoriet for teknisk Hygiejne, Danmarks Tekniske Højskole.
- o Institut for Strømningsmekanik og Vandbygning, Danmarks Tekniske Højskole.
- o Institut for Teknisk Geologi, Danmarks Tekniske Højskole.
- o Afdelingen for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.
- o Dansk Hydraulisk Institut, ATV.
- o Vandkvalitetsinstituttet, ATV.
- o Danmarks Geotekniske Institut, ATV.
- o Danmarks Geologiske Undersøgelse.

I afværgeudviklingsprojekterne og i erfaringsudvekslingsprojektet medvirker endvidere rådgivende firmaer og andre offentlige institutter.

LOSSEPLADSPROJEKTET er påbegyndt i 1987 og finansieres af offentlige midler (Miljøstyrelsen, Momsfonden og EF).

Til styring af lossepladsprojektet er oprettet et sekretariat på Laboratoriet for Teknisk Hygiejne, Bygning 115, Danmarks Tekniske Højskole, DK-2800 Lyngby.

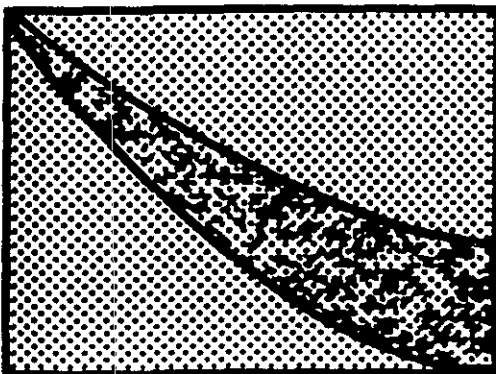
Rapporter udgivet i forbindelse med LOSSEPLADSPROJEKTET kan så længe lager høves købes hos Statens Informationstjeneste, Postboks 1103, 1009 København K. Tlf.: 01 929228 mellem 10-12. Ved indsendelse af check sammen med en bestilling undgås efterkravsgebyr.

Resultater, konklusioner og synspunkter publiceret i denne rapportserie er udelukkende de angivne forfatteres ansvar og er ikke udtryk for de bevilligende instansers holdning. Ligeledes er angivelse af produkt- og firmanavne ikke udtryk for en anbefaling fra de bevilligende instanser.

Hans-Jørgen Albrechtsen

Afdelingen for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet

MILJØSTYRELSEN
BIBLIOTEKET
STRANDGADE 29
1401 KØBENHAVN K



GRUNDVANDZONENS MIKROBIOLOGI

RAPPORT P6-1

JANUAR 1988

LOSSEPLADSPROJEKTET

SAMMENFATNING.

Det er formålet med denne rapport at sammenfatte den eksisterende og nyeste viden om grundvandets mikrobiologi: hvilke organismer, der forekommer i grundvandsmiljøet, hvordan de er tilpasset dette miljø, og hvordan de påvirkes af en nedsivende forurening.

Det er konstateret, at der er en mikrobiel flora i grundvandszonen (kapitel 2). Ved direkte mikroskoptællinger (AODC) er populationen bestemt til $0,04 - 10 \times 10^6/\text{ml}$ i uforurenede grundvand og $1,2 - 34 \times 10^6/\text{g}$ tørvægt i uforurenede grundvandssediment. Disse biomassebestemmelser understøttes af forskellige biokemiske målinger (fx phospholipid, ATP). Desuden er det med flere metoder konstateret, at dele af den registrerede biomasse er aktiv.

Resultaterne fra den foreliggende litteratur tyder på, at den mikrobielle biomasse udgøres af bakterier.

I grundvandszonen er den mikrobielle biomasse 2 - 3 størrelsesordner mindre end i overfladejord. Udover populationsstørrelsen er der også andre forskelle: biokemiske undersøgelser tyder på, at der er flere grampositive bakterier i grundvandszonen (hvilket dog endnu ikke har kunnet eftervises ved bakterieisoleringer), og at indholdet af oplagstoffer (fx PHB) er større hos bakterier i grundvandszonen. Een undersøgelse tyder på, at grundvandsbakterierne er mere specialiserede (dvs. at den enkelte bakterie kan omsætte færre substrater) end bakterier fra overfladevand og spildevand. De få undersøgelser, der er foretaget af bakteriepopulationens sammensætning, tyder også på, at der er tale om en selvstændig bakteriepopulation i grundvandszonen, og at den er forskellig fra overfladejordens.

Der er præsenteret en tabel med bakterier fra grundvandszonen. De fleste undersøgelser er udført på vandprøver, og kun i enkelte tilfælde er grundvandssedimentet blevet undersøgt.

Det lave indhold af næringsstoffer i grundvand, bakteriernes høje indhold af oplagstoffer, deres morfologi (overfladestrukturer mm.), og at der er

flere bakterier, der vokser frem på næringsfattige end på næringsrige vækstmedier, tyder på, at bakterierne er oligotrofe (kapitel 3). Hvis bakterierne er tilpasset en oligotrof levevis, skal der tages hensyn til dette ved forsøg på at dyrke eller opformere dem (hvad enten det er ved laboratorieforsøg eller forsøg på at stimulere bakterierne in situ for at rense forurenede grundvand).

Nogle oligotrofe bakterier kan ikke vokse ved høje substratkoncentrationer, og på grund af deres høje substrataffinitet (dvs. at de kan optage substrater ved lave koncentrationer) kan de være følsomme overfor toksiske stoffer. Desuden er oligotrofe bakterier hele tiden aktive (dvs. ingen hvilestadier) og har lav substratspecificitet, hvilket kan være en fordel ved nedbrydning af forurenende stoffer. Der er dog uoverensstemmelser i litteraturen, om oligotrofe bakterier er særligt egnede til at nedbryde forurenende stoffer: på trods af den forventede lave substratspecificitet er der nogle oligotrofe bakterier, der ikke kan vokse på letnedbrydelige substrater som fx glucose. Desuden er der undersøgelser, der viser, at nogle grundvandspopulationer ikke kan omsætte chlørbenzener, og andre viser, at grundvandsbakterierne har et begrænset spektrum af enzymer. Det forventes også, at oligotrofe bakterier er aerobe, hvilket ikke er tilfældet for alle grundvandsbakterier.

Selv om grundvandsbakterier muligvis ikke er oligotrofe, udviser de oligotrofe træk, og træk der viser metabolisk stress.

En anden tilpasning til det oligotrofe miljø er bakteriernes fasthæftning til mineralpartiklernes overflader. Nogle undersøgelser tyder på, at størstedelen af den mikrobielle population i grundvandszonen netop er fasthæftet (kapitel 4). Det er navnlig små partikler (<20 µm) bakterierne er hæftet til. Denne fasthæftede population fungerer muligvis som "pufferlager" for den fritlevende population, og det er derfor vigtigt at inddrage dette aspekt ved prøvetagning, da vandprøver næppe afspejler variationen i den samlede population. Fasthæfningsmekanismerne omtales også i dette kapitel.

Selv om den fritlevende population er en mindre del af den samlede popula-

tion, er den interessant, fordi den muligvis kan transporteres (kapitel 5). Ved en forurening er det væsentligt at afklare, om der med perkolatfanen transporteres organismer, der kan nedbryde de forurenende stoffer, eller om populationen i det uforurenede grundvand foran fanen adapteres til nedbrydningen. De hidtidige undersøgelser om transport af bakterier i jord og grundvand, der først og fremmest bygger på undersøgelser af nedsivning af fæcale bakterier fra septictanke, er vanskelige at overføre på en forureningssituation ved en losseplads. Der er opstillet en tabel, der i det omfang det er muligt, belyser forhold af betydning for overlevelse og transport af bakterier i jord.

Den umættede zone danner for bakterier en ret effektiv barriere mellem overfladejorden og grundvandet. Derimod er der større mulighed for, at bakterierne kan overleve og transporteres i den mættede zone. Desuden er det i laboratorieforsøg påvist, at bakterier, der er isoleret fra miljøet, og som kan nedbryde bestemte miljøfremmede stoffer, kan overleve og bevare nedbrydningsaktiviteten i jordsøjler i længere tid - og bevæge sig aktivt mod vandstrømmen henimod substratet.

Ved forurening af grundvandet med organiske stoffer, der forøger substratkoncentrationen, forøges bakterieantallet - flere undersøgelser er sammenstillet (kapitel 6). Desuden kan populationen forskydes, således at der bliver flere gramnegative bakterier. Den mikrobielle aktivitet kan også forøges og organismernes energetiske status forbedres.

Betydningen af en forurening for nedbrydningen af miljøfremmede stoffer omtales kort sammen med mulighederne for in situ-rensning af forurenede grundvand ved stimulering af de naturligt forekommende bakterier.

Afsluttende konkluderes det, at den eksisterende viden om grundvandsmiljøets mikrobiologi er meget begrænset, og at det er nødvendigt at foretage en lang række eksperimenter og undersøgelser for at kunne vurdere effekterne af forureninger og mulighederne for mikrobiel nedbrydning af de forurenende stoffer.

SUMMARY IN ENGLISH

Albrechtsen, H-J. (1987): Ground Water Microbiology: A Literature Review. Lossepladsprojektet, Report P6-1, January 1988. ISBN 87-503-7118-5.

The purpose of this report is to summarize the existing knowledge on microbiology in ground water, With emphasis on the influence of pollution on microorganisms based on the most recent publications

It has been demonstrated that there exists a microbial flora in the ground water zone (Chap. 2). The number of bacteria in unpolluted sites have been estimated to $0.04 - 10 \times 10^6/\text{ml}$ in ground water by direct microscopic counts (AODC) and to $1.2 - 34 \times 10^6/\text{g}$ dry weight in sediment. The numerical determination are in concordance with different biochemical measurements (e.g. phospholipids, ATP). Several methods have been used to demonstrate that at least parts of the biomass are active. The available literature indicates that the entire microbial biomass is composed of bacteria.

In the ground water zone the microbial biomass is 2 - 3 orders of magnitude smaller than in the soil near the surface. Biochemical investigations indicate more Gram-positive bacteria in the ground water zone than at the soil near the surface (which has not yet been demonstrated by classical methods), and that the content of storage substances (e.g. PHB) is widespread among bacteria in the ground water zone. One investigation shows that the bacteria in the ground water are more specialized than bacteria from surface water and waste water. The few investigations of the composition of bacterial communities also indicate that the bacterial population living in the ground water zone is autochthonous.

A table (2.5.) of bacterial species from the ground water zone is presented. Most of the investigations are carried out on water samples and only few have investigated the ground water sediment.

Indication of oligotrophic ground water bacteria are low content of

nutrients in ground water, the high content of storage substances, special morphology (e.g. surface structures) and the fact that a larger fraction of isolated bacteria can grow on poor growth media than on rich growth media (Chap. 3). Some oligotrophic bacteria can not grow at high substrate concentrations and because of their high substrate affinity they may be sensitive to toxic substances.

Oligotrophic bacteria have no resting stages and they have low substrate-specificity which may be an advantage with respect to the degradation of pollutants. There are however some discrepancy in the literature concerning the fitness of oligotrophics to degrade pollutants: in spite of the expected low substrate specificity some oligotrophic bacteria are not able to grow on glucose. Furthermore some investigators have shown that the population of groundwater bacteria is unable to degrade chlorobenzenes and other have found that the ground water bacteria have a limited spectrum of enzymes. It is also expected that oligotrophic bacteria are aerobic which is not the case for all ground water bacteria.

Even though all ground water bacteria may not be oligotrophic they have oligotrophic characteristics and they show metabolic stress.

An further adaption to the oligotrophic environment is the attachment of the bacteria to the surface of mineral particles. Some investigations indicate that the major part of the microbial population in the ground water zone is attached (Chap. 4), especially to small particles (< 20 um). This attached population may be a "buffer" to the freeliving population and it is therefore important not only to examine water samples but the sediment as well to show the variation in the total population. The mechanisms for attachment are discussed in the same chapter.

The freeliving bacteria are a minor part of the total population, but are of interest because they may be transported (Chap. 5). It is of importance to clarify if organisms which are able to degrade pollutants are transported with the leachate, or if the population in the unpolluted ground water adapts to the new components before degradation. The investigations on transportation of bacteria in the soil and in the ground water are based on

investigations on migration of faecal bacteria from septic tanks and are difficult to apply to the pollution situation at a dump. The conditions of importance to survival and transport of bacteria in the soil are shown in table 5.2.

The unsaturated zone is an effective barrier between the surface and ground water, but there is a good possibility for survival and transport of bacteria in the saturated zone. It has been demonstrated that bacteria degrading certain pollutants are able to survive and maintain the degrading activity in a soil column for a long period - and to move actively towards the substrate.

A pollution of the ground water with organic substances will increase the number of bacteria (chap. 6). Some investigations are compared in table 6.1. Changes of the population to contain a higher part of Gram-negative bacteria are seen. The microbial activity and the energetic status of the organisms may also increase.

It is briefly discussed how a pollution influence the degradation of pollutants and the possibilities of in situ-treatment of polluted ground water by stimulation of the natural population of bacteria.

It is finally concluded that the existing knowledge on microbiology in the ground water environment is very limited, and that it is necessary to increase bacteriological investigations to assess the effects of pollution and the possibilities of microbial degradation of pollutants.

INDHOLDSFORTEGNELSE.

Sammenfatning

Summary

| | |
|--|----|
| 1. INDLEDNING | 1 |
| 2. GRUNDEVANDSZONENS MIKROBIOLOGI | 3 |
| 2.1. Forekomst af mikroorganismer i grundvandszonen | 4 |
| 2.2. Sammensætning af den mikrobielle population | 10 |
| 2.3. Grundvandszonens mikrobiologi i forhold til overfladejordens .. | 12 |
| 3. GRUNDEVANDSZONEN SOM OLIGOTROFT MILJØ | 19 |
| 3.1. Er grundvandsbakterierne oligotrofe? | 23 |
| 3.2. Oligotrofe bakteriers betydning for omsætning af miljøfremmede stoffer | 27 |
| 4. FASTE OVERFLADERS BETYDNING FOR BAKTERIER I GRUNDEVANDSZONEN | 29 |
| 4.1. Næringsforholdenes betydning | 30 |
| 4.2. Betydningen af partiklernes størrelse | 32 |
| 4.3. Mikroorganismernes fasthæftningsmekanismer | 33 |
| 4.4. Partikelbundne bakteriers betydning for nedbrydnings- potentiallet | 35 |
| 5. TRANSPORT AF BAKTERIER I GRUNDEVANDSMAGASINET | 37 |
| 5.1. Hidtidige undersøgelser | 38 |
| 5.2. Påvirkning af bakterietransport | 40 |
| 5.3. Overlevelse og transport af bakterier i forurenede grundvand .. | 45 |
| 5.4. Afslutning | 47 |

| | |
|---|----|
| 6. EFFEKTER AF ORGANISK FORURENING | 49 |
| 6.1. Effekt på biomassens størrelse | 49 |
| 6.2. Effekt på sammensætningen af det bakterielle samfund | 51 |
| 6.3. Effekt på mikrobiel aktivitet | 55 |
| 6.4. Effekt på nedbrydningspotentialer for miljøfremmede stoffer ... | 57 |
| 6.5. Anvendelse af bakterier til rensning af grundvand forurenet med organiske stoffer | 59 |
| 7. KONKLUSION | 61 |
| 8. REFERENCER | 63 |
| 9. ORDLISTE | 71 |

APPENDIX 1. Metoder til bestemmelse af biomasse.

1. INDLEDNING.

Den hidtige forskning i grundvandsmikrobiologi er begrænset. Det fremgår af, at der i perioden 1975-85 kun er publiceret ca. 500 videnskabelige artikler med temaet "mikrobiologi i grund- og drikkevand". Ud af 221 artikler med dette tema i tidsskriftet "Applied and Environmental Microbiology" i førnævnte tidsrum var der 209 artikler om drikkevand og kun 12 artikler om grundvand (Dott et al. 1986). Litteratursøgningen til nærværende projekt, der blev udført i databasen Biosis, viste, at der i perioden 1983 - 1.6.1987 kun var 137 referencer om grundvand og mikrobiologi. I databasen Enviroline var der 158 referencer om emnet (efter frasortering af referencer om septictanke o.l.) i perioden 1980 - 30.6.1987.

Mange af undersøgelserne handler om forurening fra spildevandsudledninger eller septictanke og fokuserer på forekomsten af pathogene organismer. Dermed er en stor del af undersøgelserne foretaget ud fra synsvinkler, der er mindre relevante for problemstillingen "mikrobiologi i grundvand, forurenede fra lossepladser".

Denne rapport's formål er at sammenstille den nyeste viden om, hvilke organismer der forekommer i grundvandsmiljøet, hvordan de er tilpasset dette miljø, og hvordan de påvirkes af en nedsivende forurening fra en losseplads.

Dette er i overensstemmelse med afslutningsdebatten på en af de første internationale kongresser om grundvandsmikrobiologi (Kuopio, Finland 4-6 august, 1987), hvor consensus var, at det er vigtigt med en mikrobiologisk karakterisering af grundvandsmiljøet.

I et vist omfang vil der i rapporten også blive diskuteret, hvilken betydning mikroorganismene har for omsætning af forurenende stoffer, og for en optimering af disse processer. Andre projekter i Lossepladsprojektet vil i højere grad behandle dette emne.

2. GRUNDEVANDSZONENS MIKROBIOLOGI.

Det har længe været kendt, at der er et stort antal mikroorganismer i jord. Allerede i 1881 påpegede Koch (cit. i Waksman, 1916) dette, men også at antallet falder med dybden, og at i én meters dybde er jorden næsten fri for bakterier. En lang række undersøgelser (Waksman, 1916) har senere bekræftet, at bakterietallet i jorden falder med dybden. På grund af de lave bakterietal i dybere jordlag er der derfor kun blevet udført mikrobiologiske undersøgelser i grundvand, hvis der har været forventning om en forurening med pathogene organismer.

Selv om det forventes, at der er nogen mikroorganismer i de dybe jordlag og i grundvandszonen, og at de er aktive, har der frem til begyndelsen af firserne kun været få undersøgelser, der har påvist bakteriernes forekomst, og ingen, der har påvist, at de er aktive (Ghiorse & Balkwill, 1985).

Indtil for nyligt har interessen for grundvandsmikrobiologi først og fremmest været koncentreret om risikoen for spredning af vandbårne sygdomme. Men i de fleste tilfælde er denne risiko begrænset til lokale overfladenære brønde eller borer, og det er ofte overfladevand, der er skyld i forureningerne.

Udover at forårsage akutte sygdomme, er der også risiko for, at mikroorganismer i grundvand/drikkevand kan producere toxiner eller allergener. Der er kendt flere tilfælde fra Sverige, hvor folk har fået allergiske anfald ved at gå i bad (Bitte Erlandsson, pers. com.).

De senere års forøgede nitratnedslivning til grundvandet har øget interessen for, i hvor høj grad denitrificerende bakterier i dybe jordlag kan reducere nitratbelastningen og dermed beskytte grundvandet.

Nogle steder giver den forøgede vandindvinding problemer med øget indhold af jern og mangan i grundvandet - antageligt fordi redoxforholdene ændres i grundvandsmagasinet, når grundvandsspejlet sænkes. Dette problem kan afhjælpes ved at udnytte bakteriers evne til at oxidere jern og mangan, der

fælder ud og dermed fjernes fra vandet. Denne proces kan optimeres ved at pumpe iltrigt vand ned i et område omkring boringen, så redoxpotential og pH forhøjes. Dette kaldes Vyredox conceptet (Ward & Lee, 1985, Seppänen, 1987).

Ved udsivninger fra lossepladser kan mikroorganismer indgå i en lang række processer. Dette gælder såvel komplekse forhold ved oxidation af jern, mangan og svovl, og reduktion af de samme stoffer ved lave redoxforhold, hvor de fungerer som elektronacceptorer. I disse processer kan tungmetaller også indgå, hvorved de ofte udfældes. Desuden kan mikroorganismene omsætte forurenende, evt. miljøfremmede, organiske stoffer, hvilket vil blive uddybet senere.

2.1. FOREKOMST AF MIKROORGANISMER I GRUNDEVANDSZONEN.

I forskellige nyere undersøgelser er der blevet påvist en mikrobiel population i grundvandszonen.

Det fremgår af tabel 2.1, at der ved direkte mikroskoptælling efter farvning med acridin orange (AODC) kan findes $0,04-10 \times 10^6$ bakterier/ml i uforurenede grundvand og $1,2-34 \times 10^6/g$ t.s. i grundvandssediment. Der er således en ret lille variation i antallet på trods af, at der er tale om 13 undersøgelser på forskellige lokaliteter.

Ved pladespredning, hvor antallet af kolonidannende bakterier (cfu) tælles, er spredningen langt større. Der er rapporteret $0.001-280 \times 10^4$ cfu/ml i grundvandsprøver og $<10^2-3,5 \times 10^6$ cfu/g t.s. i grundvandssediment (se tabel 2.1). En del af denne store spredning skyldes, at der er benyttet forskellige medier i de forskellige undersøgelser, og at der er stor forskel på mediernes egnethed. Inden for samme undersøgelse med samme medie kan der dog også være stor variation, og der er sjældent korrelation mellem de direkte tællinger og tællinger ved hjælp af pladespredning (Balkwill & Ghiorse, 1985). Ved pladespredning opgøres bakterietallet ofte til mindre end 1% af, hvad der opnås ved direkte tællinger, men på særlige næringsfat-

Tabel 2.1. Bakterietællinger i uforurennet grundvand.

| Lokalitet | Dybde (m) | Måtningsgrad.1) | Prøve-type 2) | AODC 3) x10 ⁶ | CFU 4) x10 ⁴ | Reference |
|----------------------------------|--------------------|-----------------|---------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Gassehaven, DK | 3,5-6,2 | M | V | 0,07 /ml | | Aamand & Jørgensen, in prep. |
| Sandbjerg, DK | 5,5 | M | V | 0,33 /ml | | do |
| Lula, Oklahoma, USA | 1,2 | U | S | 6,8- 9,8 /g ts. | 3,1- 19 /g ts. | Balkwill & Ghiorse (1985) |
| do | 4,9-5,5 | M | S | 3,8- 9,3 /g ts. | 0,07- 3,5 /g ts. | do |
| Honeycut Creeks, Alberta, Canada | 1,5 | M | V | 0,03-0,14/ml | 0,06- 0,84/ml | Buchanan-Mappin et al. (1986) |
| Paris Basin, Frankrig | 1000-2000 | M | V | | 0,01- 0,03/ml | Daumas et al. (1986) |
| Minnesota, USA | ? | M | V | 1 - 10 /ml | | Ehrlich et al. (1983) |
| Bonn, BRD | 15 | M | V | | 0,005 /ml | Gehlen et al. (1985) |
| Ft. Pork Louisiana, USA | 1 - 5,5 5,1-6,7 | U M | S S | 1,6-15 /g ts. 2,7 -8,9 /g ts. | <0,01-10 /g ts. | Ghiorse & Balkwill (1983) |
| Oklahoma, USA | ? | ? | S | 5,2 /g ts. | 0,6-310 /g ts.* | Ghiorse & Balkwill (1985) |
| Cape Cod, Mass., USA | 20-31 20-31 | M M | V S | 0,04 /ml 11 - 34 /g ts. | | Harvey et al. (1984) |
| Canada | 1,5 | M | V | | 14 - 283 /ml | Ladd et al. (1982) |
| Fulda, BRD | 3,3-4,5 | ? | V | 2 - 3,7 /ml | | Marxsen (1981) |
| Grindsted, DK | 4-7,5 | M | V | | 5 - 8 /ml | Matthiesen & Christensen (1985) |
| Ohio, USA | 10-12 | M | V | 0,04-0,06/ml | 0,05- 0,4 /ml | Ventullo & Larson (1985) |
| Lula, Oklahoma USA | 1,2-3,1 4,6-6,3 | U M | S S | 5 - 7 /g ts. 4 - 9 /g ts. | | Webster et al. (1985) |
| Conroe, Texas USA | 7,8-9,0 | M | S | 1,2- 16 /g ts. | | do |

1) Prøve taget fra mættet (M) eller umættet (U) zone. 2) Vandprøve (V) eller sedimentprøve (S). 3) Direkte tælling efter farvning med acridin orange. 4) Pladespredning, tælling af kolonidannende enheder (cfu). *) Flere forskellige medier. ? oplysning mangler.

tige medier kan man nå op til 50% af de direkte tællinger (Ghiorse & Balkwill, 1985).

Ved direkte tællinger er det vanskeligt at skelne mellem levende og døde,

aktive og hvilende celler. Ved elektronmikroskopiske undersøgelser observeres der ofte tomme cellemembraner (ghost cells) (Ghiorse & Balkwill, 1985), og det er derfor muligt, at der ved direkte tællinger estimeres en for stor biomasse. Ved pladespredning tælles derimod kun de organismer, der er i stand til at dele sig - dvs. levende celler. Det er dog en forudsætning, at organismene kan vokse på det benyttede substrat - og da det er umuligt at skabe et substrat, hvorpå alle organismene kan vokse, vil denne metode derfor altid estimere en for lille biomasse. F.eks. har studier af *Legionella pneumophila* (en patogen bakterie, der bl.a. forekommer i vandtanke) (Hussong et al., 1987) vist, at i nogle stadier er det ikke muligt at dyrke denne på agarmedier, selv om kulturen stadig kunne vokse i kyllingeembryoner. Efter vækst herpå kunne cellerne igen dyrkes på agar. Selv om substratsammensætningen har stor betydning, skyldes en del af variationen ved pladespredning sandsynligvis, at antallet af aktive organismer varierer mellem lokaliteterne.

Den mikrobielle biomasse kan også opgøres ved forskellige biokemiske metoder, hvor enten forskellige cellebestanddele eller enzymaktiviteter benyttes til at estimere biomassen. I tabel 2.2 er der opstillet en række af de mest benyttede biokemiske analyser. Da analysefølsomheden er vigtig, når metoden skal anvendes til grundvandsanalyser, hvor biomassen er lille, er følsomheden også angivet.

Det er vigtigt at være opmærksom på de forskellige metoders begrænsninger, og for en række af de mest benyttede metoder er der i appendix 1 angivet måleprincip og begrænsninger.

For at disse biokemiske mål kan sammenlignes, omregnes biomassen til celleantal. Dette omregningstrin er imidlertid ofte problematisk. Eksempelvis varierer ATP/biomasse-forholdet i forskellige vækstfaser, men er nogenlunde konstant i den eksponentielle vækstfase. Det forudsættes derfor, at den undersøgte population er i denne fase. Under sultbetingelser kan ATP-indholdet reduceres 3-16 gange, og da dette ofte forekommer i grundvandszonen, påvirkes det beregnede resultat (Webster et al. 1985).

Indholdet af muraminsyre er forskelligt i grampositive og gramnegative

Tabel 2.2. Forskellige biokemiske metoder til bestemmelse af biomasse. Analysernes følsomhed (angivet i antal E. coli celler) og tidsforbrug er angivet (Leach, 1984).

| Metode | Antal E. coli-celler/ml | Analysetid (timer) ^a |
|---|-------------------------|---------------------------------|
| ¹⁴ CO ₂ produktion fra lactat | 1 - 10 | 6 |
| Limulus amebocytlysat for LPS | 1 - 100 | 1 |
| H ₂ - udvikling | 1 | 8 |
| Impedance | 1 - 10 ⁵ | 10 el. 2 |
| Elektron transport | 10 ⁸ | 0,25 |
| Glutamin dehydrogenase | 1 | 10 |
| Beta-galactosidase, colorimetric | 10 ³ | 9 |
| Beta-galactosidase, fluorimetric | 10 ⁵ | 1,5 |
| Gas chromatografisk måling af ethanol | 5 | 9 |
| ATP | 10 ³ | 0,17 |
| Jern porphyriner | 10 ³ | 2 |
| Immunoenzymatisk | 10 ² | 1 |
| Muraminsyre | 3x10 ⁸ | 17 |
| Protein, Lowry | 10 ⁸ | 2 |
| Protein, bromosulfalein | 10 ⁷ | 3 |
| Protein, o-phthalaldehyde | 3x10 ⁴ | 10 |
| DNA, diphenylamine | 10 ⁸ | 2 |
| DNA, DAPI | 3x10 ⁴ | 0,5 |
| Lactat dehydrogenase | 1x10 ⁶ | 2 |
| Alkalin phosphatase | 9x10 ⁴ | 24 |
| Katase | 10 ⁷ | 2 |
| Adenylat kinase | 4x10 ⁵ | 2 |
| Lipid phosphat | 10 ⁸ | 30 |
| Poly-beta-hydroxybutyrat | 10 ⁵ | 5 |

a) Analysetiden blev estimeret, hvis den ikke var angivet i proceduren.

bakterier, og for at benytte denne metode til at bestemme populationens biomasse er det derfor nødvendigt at forudsætte et bestemt forhold mellem disse grupper. I en undersøgelse (Ghiorse & Balkwill, 1985) estimeres bakterieantallet 10-100 gange større ud fra indholdet af muraminsyre end fra direkte tællinger.

Det er således problematisk at udtrykke koncentrationen af biokemiske indholdsstoffer i form af celletal, men på trods af dette er der rimelig overensstemmelse mellem en række biokemiske målinger (tabel 2.3) og de direkte tællinger.

Det er imidlertid ikke givet, at den observerede biomasse er levende og aktiv, hvilket er vigtigt at afklare. Det fremgår af elektronmikroskopiske (EM) undersøgelser af grundvandsprøver, at der er konstateret celler i delingsfase (tværvægge) (Ghiorse & Balkwill, 1985), hvilket viser, at i fikseringsøjeblikket var disse celler aktive. Harvey & George (1986) har benyttet dette til at bestemme frekvensen af delende celler som udtryk for generationstiden.

Som omtalt tidligere kan en del af bakterierne dyrkes på laboratoriemedier. Dette viser, at bakterierne er levende, men ikke om de er i hvile i det uforstyrrede grundvand og først bliver aktive, når de podes på mediet. Balkwill & Ghiorse (1985) oplyser, at de ved EM-undersøgelser ikke observerede bakterier i hvilestadium (endosporer). Ved at kombinere 2 farvemethoder: (AODC og INT) understøttet af ATP-måling, kunne Webster et al. (1985) konstatere, at 1-10% af det totale celleantal var metabolisk aktive. Inkubering med nalidixinsyre, der hindrer celledeling, hvorved metabolisk aktive celler bliver meget større end de inaktive, viste, at 26-40% af det totale celleantal (AODC) var metabolisk aktiv (Buchanan-Mappin et al. 1986). Da metoden kun virker for gramnegative bakterier, må en meget stor del af den undersøgte population være metabolisk aktiv. Ud over de her nævnte metoder er der i grundvand også blevet målt fluorescein diacetat (FDA) hydrolyse som mål for den samlede mikrobielle aktivitet (Federle, In press og Federle et al., 1986).

Tabel 2.3. Resultat fra forskellige metoder til bestemmelse af den bakterielle population. Resultaterne er både udtrykt i måleenheder og omregnet til celletal.

| Mål | Måleenheder pr. g ts. | Antal celler. $\times 10^6$ /g ts. | Reference |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| ATP | 0,006 - 3,1 ng | 0,03 - 15 | Webster et al. (1985) |
| AOINT 1) | | <0,2 - 0,8 | Webster et al. (1985) |
| Phospholipid | 0,5 - 1,0 nmol | 14 - 20 | Gehron et al. (1984) |
| Phospholipid FAME 2) | 1,1 - 5,3 nmol | 11 - 53 | Gehron et al. (1984) |
| Muraminsyre | 0,6 - 2,1 nmol 0,6 - 2,0 - 4 - | 7 - 71 | Gehron et al. (1984) White et al. (1983) Ghiorse & Balkwill (1985) |
| Glycerol teichoic acid (Gram posi- tive bakt.) | 4,3 - 29 nmol | 31 - 210 | Gehron et al. (1984) |
| LPS-lipid A OH FAME 3) (Gram nega- tive bakt.) | 0,09 - 0,15 nmol | 5 - 10 | Gehron et al. (1984) |

1) Antal celler der farves med både acridin orange og INT. (aktive celler).
2) Fedtsyre methylestre (FAME). 3) Hydroxy fedtsyremethylestre (OHFAME) i
Lipophosphorsaccharid (LPS).

Endelig kan den mikrobielle population omsætte en række organiske forbindelser, (Marxsen, 1981, Ward, 1985 og Ventullo & Larson, 1985). Dette viser, at i hvert fald dele af den mikrobielle population er metabolisk aktiv.

Det kan konkluderes, at det med en række forskellige metoder er påvist, at der eksisterer en mikrobiel population i grundvandsmagasinet, og at en del af den er aktiv.

2.2. SAMMENSÆTNING AF DEN MIKROBIELLE POPULATION.

Da mikrobiologien i grundvandet kan omfatte forskellige typer mikroorganismer, er det relevant at undersøge sammensætningen af den mikrobielle population.

I flere undersøgelser, hvor der er foretaget direkte tællinger af mikroorganismer (Harvey et al. 1984, Wilson et al. 1983) anføres det, at der kun er observeret bakterier. I undersøgelser (Hirsch & Rades-Rohkohl, (1983), og Hoos & Schweisfurth (1982) cit. ibid), hvor der er isoleret organismer fra grundvand, er der kun fundet få gær- eller hyfesvampe, og i den ene undersøgelse blev der ikke fundet svampe dybere end 10 m. I vand fra drikkevandsboringer i Sverige, er der blevet isoleret 18 forskellige hyfesvampe (Bitte Ehrlundsson pers. kom.). De identificerede svampeslægter er alle almindeligt forekommende i mange miljøer, og der er antageligt tale om, at svampene er transporteret ned fra overfladen.

Andre forfattere (Buchanan-Mappin et al. 1986) skriver om problemer med fremvækst af svampe på agarplader til bakterietælling, når de blev podet med grundvandsprøver. Disse grundvandsprøver blev taget fra et grundvandsmagasin, meget nær overfladen (1,5 m), hvilket antageligt er forklaringen på svampenes tilstedeværelse. Det fremgik ikke af undersøgelseerne, om svampene voksede i grundvandet, eller om de blot forekom som sporer.

I biokemiske undersøgelser benyttes lange fedtsyrer (>19 carbon atomer) i phosphorlipidfraktionen som indikator for forekomst af mikroeukaryoter (fx gær- og mikrosvampe). Med denne metode er der ikke i grundvandet (10 m) - i modsætning til andre miljøer - fundet nogen tegn på mikroeukaryoter (Smith et al. 1986, White et al. 1983).

Når der ikke er fundet andre organismer end bakterier i grundvandet, kan det skyldes, at der ikke er benyttet metoder specielt designet til dette formål. Selv om der benyttes sådanne metoder, konkluderer Sinclair & Ghiorse (1987), at de protozoer, der er konstateret ned til 0,5 m under jordoverfladen, antageligt er transporteret derved fra overfladen, og at protozoernes økologiske betydning i dybe lag er minimal.

I et grundvandsmagasin (12-24 m), forurenet med organisk stof fra spildevand, er der fundet makroinvertebrater (dvs. dyr større end 1 mm, fx isopoder) (Sinton, 1984). Der blev fundet ca. 1 pr liter. Da ca. 10% af individerne indeholdt coliforme bakterier, mener forfatterne, at makroinvertebraterne lever af materiale fra spildevandet - incl. bakterierne. Desværre er hverken bakterieantallet eller indholdet af organisk stof oplyst. I uforurenet grundvand er der næppe tilstrækkeligt organisk stof til at oppebære en makroinvertebratfauna - men i svagt forurenet grundvand, hvor ovenstående undersøgelse er udført, er indholdet af organisk stof antageligt blevet forøget. Ved kraftig forurening kan makroinvertebrater derimod næppe leve, da iltindholdet vil være reduceret.

Udfra den nuværende viden, kan det konkluderes, at den altovervejende biomasse i grundvandsmiljøet er bakterier. Der er fundet makroinvertebrater i grundvand med en svag organisk forurening, og under disse forhold kan populationen af makroinvertebrater have en kvalitativ betydning ved græsning af bakteriepopulationen. Det er dog kun i ét tilfælde, at disse makroinvertebrater er fundet, og det er derfor uvist, hvor mange steder de forekommer.

2.3. GRUNDVANDSZONENS MIKROBIOLOGI I FORHOLD TIL OVERFLADEJORDENS.

Den bakterielle biomasse (opgjort vha. AODC, phospholipid- og ATP-bestemmelse) i den uforurende grundvandszone er 2-3 størrelsesordner mindre end i overfladejord (se tabel 2.4). I enkelte tilfælde (Wilson et al. 1983, Ladd et al. 1982) er der ikke fundet nogen forskel, hvilket kan skyldes, at prøverne er taget ret overfladenært (fx 5 m). Det fremgår også af tabellen, at glycolipid/phospholipid- og teichon syre/phospholipid-ratierne forøges i grundvandszonen, hvilket viser, at andelen af grampositive bakterier er større i grundvandszonen. Målingerne er noget usikre, men ved elektronmikroskopiske (EM) undersøgelser fandt Wilson et al. (1983) ligeledes en stor andel af grampositive bakterier. Ghiorse & Balkwill (1983) rapporterer også dette, og i de samme prøver fandt White et al. (1981 cit. ibid) en høj muraminsyre/lipid A - ratio, hvilket også viser en stor andel af grampositive bakterier.

Disse resultater har det imidlertid ikke været muligt at verificere i undersøgelser, hvor grundvandsbakterier er blevet isoleret, dyrket og identificeret. Gehlen et al. (1985) fandt, at de fleste af de 90 tilfældige isolater (fra vandprøver) var gramnegative, hvilket Hirsch & Rades-Rohkohl (1983) og Stetzenbach et al. (1986) også fandt. Selv om Balkwill & Ghiorse (1985) ved EM-undersøgelser af grundvandssediment fandt, at 85-90% af organismerne var grampositive stave, var flertallet af de organismer, der kunne dyrkes, gramnegative. Det er uvist, hvorvidt dette skyldes, at kun de gramnegative bakterier er levende i grundvandet eller at medierne er selektive, således at det først og fremmest er gram-negative bakterier, der kan vokse på medierne.

I overjord finder Alexander (1977) til sammenligning, at 25-54% af bakterierne er grampositive og 19-29% er gramnegative. I danske skovjorde finder Jensen (1963) at 31-70% af bakterierne i overjorden er grampositive og 23-66% er gramnegative. Disse undersøgelser, der er baseret på gramfarvning af isolerede (dyrkede) bakterier, viser, at der er lige stor forekomst af grampositive og gramnegative bakterier i overjord.

Tabel 2.4. Sammenligning af forskellige mikrobiologiske parametre mellem overfladejord og grundvandszonen.

| Metode | Enhed /g t.s. | Overflade- jord | Under- grunden | Reference |
|---|------------------|--------------------|-------------------|---|
| AODC | $\times 10^8$ | 1-100 | 0.01-0.1 | Alexander (1977), Dette projekt tab.2.1. |
| Total phospholipid | nmol | 4,2 2,1 | 0,18 0,07 | Smith et al. (1986) Gehron et al. (1984) |
| ATP | ng | 44-500 | 0,01-3,1 | Webster et al. (1985) |
| Glycolipid/ phospholipid (grampositive bakterier) | Ratio | 0,4 | 3,6 | Smith et al. (1986) |
| Teichoic acid/ phospholipid (grampositive bakterier) | Ratio | 8,8 18 | 56 | Smith et al. (1986) Gehron et al. (1984) |
| Neutral lipid/ phospholipid | Ratio | 0,9 | 7,1 | Smith et al. (1986) |
| Poly hydroxy butyrat/ phospholipid | Ratio | 0,6 | 9,1 | Smith et al. (1986) |
| Total lipid hydroxy fedtsyre/ phospholipid | Ratio | 0,03 | 1,8 | Smith et al. (1986) |
| Total polymer carbohydrate/ phospholipid | Ratio | 53 | 69 | Smith et al. (1986) |
| Mikrobiel heterotrof aktivitet (t _{1/2}) | | | | |
| Glucose aerob | h | 4,6 | 25,6 | Ward (1985) |
| anaerob | h | 1,2 | 19,0 | do |
| Glutaminsyre aerob | h | 2,5 | 18,1 | do |
| anaerob | h | 1,7 | 16,7 | do |
| Stearinsyre aerob | h | 118,3 | 312,2 | do |

Det fremgår også af tabel 2.4, at det relative indhold af polyhydroxybutyrat (PHB) og polymer-carbohydrat er større i grundvandszonen end i overjorden. PHB er et oplagsstof, der ophobes i bakterier under sultbetingelser, og indholdet af polymer-carbohydrat indikerer tilstedeværelsen af en kappe (glycocalyx) omkring bakterierne. Disse forhold tyder på, at bakteriepopulationerne i de dybe jordlag er mere oligotrofe end populationerne i overfladejord - hvilket vil blive behandlet i næste kapitel.

Det er blevet fremhævet, at bakterierne i grundvandszonen er meget små: mindre end 1 um (Wilson et al. 1983) og mindre end 0,8 um (Ghiorse & Balkwill, 1985), men dette er ikke mindre, end hvad der findes i overfladejord, hvor 58-77% af bakterierne er mindre end 0,5 um (Olsen & Bakken, 1987).

Den mikrobielle aktivitet (f.eks. målt som samlet mikrobiel heterotrof aktivitet) i de dybere jordlag er mindre end i overfladejord (tabel 2.4). Dette skyldes først og fremmest, at der er færre bakterier i dybere jordlag.

Studier af bakteriepopulationen understøtter, at der kan være tale om en selvstændig population i dybe jordlag. Ud af 40 "morfotyper" (defineret ud fra organismernes form, størrelse, pigmentering, overfladestrukturer, oplagskorn, delingsmåde, mobilitet og aggregering) fra grundvand fandt Hirsch & Rades-Rohkohl (1983) 7. aerobe og 6 anaerobe morfotyper, der kun forekom dybere end 10 m i jordprofilet. Forfatterne konkluderede, at deres data indikerede en distinkt mikroflora typisk for de nedre dele af de undersøgte boringer. Buchanan-Mappin et al. (1986) fandt ligeledes, at artssammensætningen i bakteriepopulationen i overfladenært grundvand (1,5 m) tydeligt adskilte sig fra sammensætningen i en kilde, der udsprang fra dette grundvandsreservoir.

Som nævnt tidligere falder antallet af både aerobe og anaerobe bakterier med dybden ned gennem jordprofilet (Balkwill & Ghiorse, 1985), men i overgangen mellem umættet og mættet zone i grundvandsspejlet (grundvandets overflade) finder Hirsch & Rades-Rohkohl (1983) stort set ingen bakterier.

Balkwill & Ghiorse (1985) finder både aerobe og anaerobe bakterier i grundvandet, men antallet af anaerobe bakterier var 1-4 størrelsesordner mindre end antallet af aerobe bakterier. White et al. (1983) finder i et salint grundvandmagasin et større indhold af cis-vaccenin syre (18:1w7) i prøver fra dybe lag end fra overfladen. Denne syre (dannet af enzymet desaturase) indikerer en større forekomst af anaerobe bakterier i dybe jordlag, hvilket stemmer overens med, at iltindhold forventes at falde med dybden. I drikkevandsboringer er der også fundet methylotrophe bakterier (Dott et al., 1982), dvs. bakterier, der kan oxidere bl.a. methan.

I tabel 2.5 er der givet en oversigt over de bakterier, der er fundet i grundvand. Det fremgår, at de fleste undersøgelser er udført i uforurenede vandprøver, ofte i forbindelse med drikkevandsboringer. Der er således ringe kendskab til de organismer, der er fasthæftede til partiklerne i grundvandszonen og til bakteriefloraen i forurenede grundvand. Selv i meget dybe grundvandsmagasiner (1000-2000 m) er der fundet bakterier (Daumas et al. (1986)). Der blev fundet aerobe, heterotrofe bakterier men flest anaerobe, autotrofe bakterier: sulfatreducerende og methanogene. De anaerobe bakteriers metaboliske aktivitet (bicarbonat- og glucose-assimilation) var også størst - navnlig under termofile (65°C) forhold (in situ temperaturen i boringerne var 56-79 °C). Forfatterne mener, at dette viser, at de heterotrofe bakterier er blevet tilført under borearbejdet eller ved nedsivning af overfladevand, og at den oprindelige population i de meget dybe lag bestod af chemolithotrophe, thermophile anaerobe bakterier.

I et enkelt tilfælde er den mikrobielle population i grundvand blevet sammenlignet med mikrobielle populationer fra andre miljøer. I denne undersøgelse (Gehlen et al. 1985) blev 90 tilfældige isolater fra grundvand (vandprøve), overfladevand (vandreservoir) og aktivt slam undersøgt vha. numerisk taksonomi. Det fremgik, at populationens "fælles totale aktivitetsindeks" (antal fysiologiske egenskaber der blev fundet i populationen, divideret med antal testede egenskaber) var mindst for grundvandspopulationen. Ved at sammenligne aktivitetsindeks for de enkelte isolater (se figur 2.1) fremgår det, at 2/3 af isolaterne fra grundvandet havde mindre end 10%

Tabel 2.5. Bakterier der er isoleret fra grundvandszonen.

| Bakterie | Prøve- type | Reference | Bakterie | Prøve- type | Reference |
|---------------------|----------------|-----------|-----------------------|----------------|-----------|
| Acinetobacter sp. | | 10 | F. devorans | | 5,11 |
| A. calcoaceticus | | 5,7 | F. sewanense | | 11 |
| A. lwolfii | | 9 | Gallionella sp. | | 8 |
| Achromobacter sp. | | 11 | Hyphomicrobium sp. | | 5,8 |
| A. cycloclastes | | 11 | Methanobacterium sp.* | | 2 |
| A. iophagum | | 11 | Methanosarcina sp. | | 2 |
| A. eurydice | | 11 | Micrococcus sp. | | 3,5,11 |
| A. liquefacien | | 11 | M. conglomeratus | | 11 |
| A. superficiale | | 11 | M. luteus | | 5 |
| Actinomyces sp. | | 5 | M. roseus | | 5 |
| Aerococcus sp. | | 5 | M. varians | | 4 |
| A. viridans | | 5 | Microcyclus sp. | | 8 |
| Aeromonas sp. | | 3,5,9 | Micromonospora sp. | | 5 |
| Agrobacterium | | | Moraxella sp. | | 5,7,10 |
| polysphaeroideum | | 8 | Norcardia sp. | | 5,8,11 |
| Alcaligenes sp. | | 5,6 | Pasteurella sp. | | 7 |
| A. denitrificans | | 6 | Planococcus | | |
| Arthrobacter sp. | V/S | 1,5 | citreus | | 5 |
| A. globiformis | | 5 | Prosthecomi- | | |
| A. flavens | | 5 | crobium sp. | | 8 |
| Bacillus sp. | | 3,4 | Pseudomonas sp.*** | V/S | 1,3,4,5,6 |
| B. cereus | | 9 | P. acidovorans | | 3,5 |
| B. licheniformis | | 9 | P. alcaligenes** | | 3,5,10 |
| B. megaterium | | 9 | P. aeruginosa | | 6 |
| B. subtilis | | 9 | P. cepacia | | 3,5,7 |
| Bacterium sp. | | 11 | P. diminuta | | 3,5,7,9 |
| B. fulvum | | 11 | P. fluorescens | | 3,4,5,7,9 |
| Brevibacterium sp. | S | 1 | P. mallei | | 5 |
| Caulobacter sp. | | 8 | P. maltophilia | | 3 |
| Cellulomonas sp. | | 5 | P. mendocina | | 4 |
| Chromobacterium sp. | S | 1,5 | P. pseudo- | | |
| C. lividum | | 4 | alcaligenes | | 7,3 |
| C. typhiflavum | | 7 | P. pseudomallei | | 3 |
| Clostridium sp. | | 8 | *** | | |
| Coliforme | | 3 | P. putida | | 6,9 |
| Coryneforme | | 3 | P. putrefaciens | | 3,5 |
| Cytophaga sp. | | 5,7,11 | P. stutzeri*** | | 3,6 |
| Desulfoto- | | | P. testosteroni | | 3 |
| maculum sp.* | | 2 | P. thomassii | | 3 |
| Flavobacterium sp. | | 5,9,11 | P. vesiculare | | 3 |
| F. aquatile | | 5,11 | Staphylococcus sp. | | 3,5 |
| F. breve | | 5 | Streptomyces sp. | | 5 |
| | | | Xanthomonas sp. | | 5 |

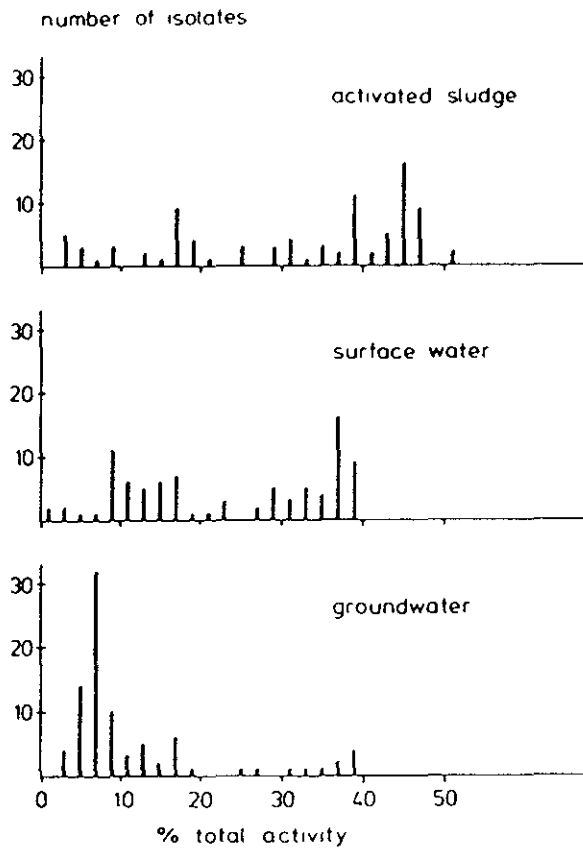
* Forurennet fra en losseplads, ** Creosot-forurennet, *** Uforurennet eller creosot-forurennet.

V: vandprøve, S: sedimentprøve, hvor intet er nævnt er organismen isoleret fra en vandprøve.

Tabel 2.5 fortsat. Bakterier der er isoleret fra grundvandszonen.

Referencer:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 Balkwill & Ghiorse (1985) | 7 Gehlen et al. (1985) |
| 2 Beeman & Suflita (1987) | 8 Hirsch & Rades-Rohkohl (1983) |
| 3 Bonde (1985) | 9 Ladd et al. (1985) |
| 4 Buchanan-Mappin et al. (1986) | 10 Stetzenbach et al. (1986) |
| 5 Dott et al. (1982) | 11 Wolters & Schwartz (1956) |
| 6 Ehrlich et al. (1985) | |



Figur 2.1. Sammenligning af fysiologisk aktivitet hos bakterier fra grundvand, overfladevand og aktivt slam. Figuren viser fordelingen af isolater mht. hvor stor en andel af de testede substrater det enkelte isolat kan udnytte (Gehlen et al., 1985).

af de undersøgte fysiologiske egenskaber, hvorimod over 1/3 af isolaterne fra det aktiverede slam havde over 40% af de undersøgte egenskaber. Dette viser, at de enkelte grundvandsbakterier kan udnytte færre vækstsustreter end bakterierne fra de andre miljøer, og derfor er mere specialiserede.

Disse resultater skal dog tages med det forbehold, at der kun er undersøgt én prøve fra hvert miljø, og der er derfor ikke kendskab til variationen inden for det enkelte miljø. Desuden var bakterietætheden meget lille i grundvandsmiljøet (4,7 cfu/ml) i modsætning til tætheden i aktiveret slam ($4,95 \times 10^7$ cfu/ml) og overfladevand ($1,01 \times 10^3$ cfu/ml). Da det er nødvendigt at dyrke bakterierne for at isolere dem og karakterisere dem fysiologisk, og da det er en lille del af det totale antal bakterier i grundvand, der kan dyrkes, er der tale om en betydelig selektion ved udvælgelse af de undersøgte isolater. Forfatterne anfører, at selv om den benyttede standard isoleringsteknik begrænser antallet af slægter, der kan undersøges, er selektionen ens for alle de undersøgte biotoper.

Det kan konkluderes, at både den relative sammensætning af biokemiske indikatorstoffer og undersøgelser af bakterieisolater tyder på, at der eksisterer en selvstændig (autochton, endogenous) og oprindelig (native) bakteriepopulation i grundvandszonen. Denne bakteriepopulation er mindre end overfladejordens, og en enkelt undersøgelse tyder på, at grundvandsbakterierne er mere specialiserede (kan udnytte færre substrater) end bakterier fra andre miljøer.

Der er fundet et større relativt indhold af stoffer, der indikerer næringsstress, i grundvandszonens bakteriepopulationer. Dette tyder på, at populationen er oligotrof, hvilket behandles i næste kapitel.

3. GRUNDVANDSZONEN SOM OLIGOTROFT MILJØ

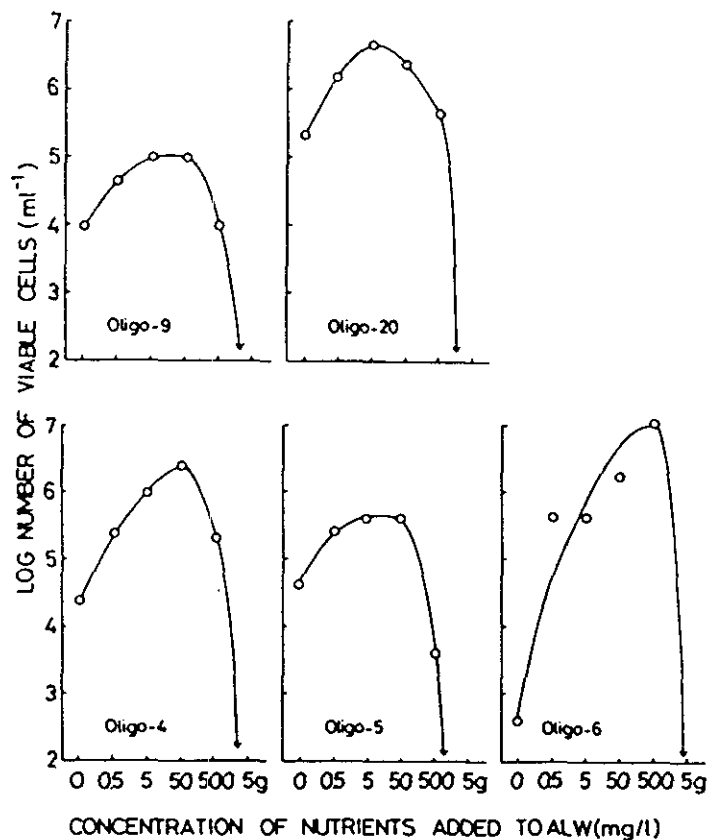
Indholdet af organisk stof i uforurennet grundvand er meget lavt; generelt: 0.1-10 mg DOC/l (Freeze & Cherry, 1979) og 2-3 mg TOC/l (Bonde, 1985). En stor del af dette organiske stof er svært nedbrydeligt, fx fulvin- og humussyrer (Freeze & Cherry, 1979) og derfor er mængden af kulstof, der er tilgængeligt for bakterierne, meget lavt. Andre næringsstoffer (N, P, K, S) kan også være begrænsende for bakterievæksten. Et sådant miljø betegnes som oligotroft.

Oligotrofe bakterier defineres som bakterier, der kan isoleres og dyrkes på medier med 1-15 mg organisk C/l (Kuznetsov et al., 1979), og da indholdet af tilgængeligt kulstof i grundvandet er så lavt, som angivet ovenfor, må det forventes, at grundvandsbakterierne er oligotrofe. Det ville være mere præcist at anvende betegnelsen "oligocarbofile", når det er kulstof, der er begrænsende for væksten, men da der i litteraturen generelt benyttes betegnelsen "oligotrofe", vil det også være tilfældet her.

Da det i virkeligheden ikke er puljen, men fluxen af organisk stof, der er bestemmende for bakterievæksten, definerer Hirsch et al. (1979) et "lav-nærings-miljø" ud fra en lav effektiv turnover rate. I en oligotrof sø er fluxen mindre end 0.1 mg C/(1 dag) (Hood, 1970, cit. i Poindexter, 1981). Desværre foreligger der endnu ikke opgørelser over kulstof-fluxene i grundvand, og det er derfor ikke muligt at benytte denne definition.

En række af de oligotrofe bakterier er ikke alene karakteriseret ved, at de kan vokse ved lave næringskoncentrationer, men også ved at de ikke kan vokse ved højere næringskoncentrationer. Ishida & Kadota (1981) har vist, at en række obligat oligotrofe bakterier har optimal vækst ved substratkoncentrationer i området 5-500 mg/l og ikke kan vokse ved koncentrationer over 1 g/l - se figur 3.1.

Dette betyder, at såfremt grundvandsbakterierne er oligotrofe, stiller det særlige krav til de dyrkningsmetoder, der anvendes ved undersøgelser af grundvandsbakterier.



Figur 3.1. Substratkonsentrationens betydning for vækst af 5 obligat oligotrofe bakterier, opgjort efter 8 dages inkubering (20°C) efter tilsætning af stigende mængder substrat (trypticase og gærekstrakt) til ældet søvand (ALW) (Ishida & Kadota, 1981).

I tabel 3.1. og 3.2. er der samlet en række egenskaber, der er fundet hos oligotrofe bakterier. En bakterie, der har alle disse egenskaber, kan betegnes som en oligotrof model-bakterie, da en sådan bakterie næppe eksisterer. En række af disse oligotrofe karakterer er væsentlige i forbindelse med bakterier i grundvand: det forventes fx at den oligotrofe model-bakterie kræver ilt (dvs. er aerob), da brug af andre elektron-acceptorer kan give ringere energiudbytte, så substratet ikke udnyttes tilstrækkeligt. Da iltindholdet er meget lavt i nogle af de grundvandsreservoir, hvor der er fundet bakterier, der ud fra næringsforholdene må betegnes oligotrofe, er her en uoverensstemmelse med beskrivelsen af den oligotrofe modelbakterie.

Tabel 3.1. Egenskaber ved næringsoptagelsen hos oligotrofe model-bakterier, og deres tilpasning til disse egenskaber. Efter Hirsch et al. (1979).

| Egenskab | Tilpasning |
|---|--|
| Høj overflade/volumen-ratio. | a) små og/eller langstrakte celler. b) ofte usædvanlig morfologi. c) relativ høj andel af optagelses-sites blandt overfladekomponenter. d) nedsat diffusionsvej fra overflade til indre udnyttelses-sites. |
| Metabolisk energi anvendes først og fremmest til næringsoptagelse, især når cellen ikke er i færd med at vokse eller dele sig. Energi spildes ikke på unødvendige aktiviteter. | a) relativ høj andel af endogen metabolisk energi forbruges til optagelse. b) besiddelse af specifikke elektron-donorer, som hurtigt kan skabe en proton-gradient til transport. Protongradienten kan være koblet til en hæmning af andre gradient-forbrugende processer. |
| Altid i stand til at optage næringsstoffer. | Kan ikke tillade sig at danne hvileceller, der ikke kan optage næringsstoffer (undt. evt. til spredning). |
| Optagelsessystemer med høj affinitet; mulighed for samtidig optagelse af blandede substrater. | a) meget følsom overfor toksiske biotiske og abiotiske opløsninger. b) ved øget næringsindhold kan et overskud af eet næringsstof påvirke optagelsen af andre. c) et næringsstof i overskud oplagres; evne til at oplagre et udvalg af oplagsstoffer kræves. |
| Optagelse vil føre til akkumulering af oplagsnæring, især når optagelsesraten ikke er maksimal og metaboliske pools ikke er mættede pga. ekstremt lav substratkoncentration, men antageligt også når substratet er tilstrækkeligt til balanceret vækst. | Relativt lav maksimalvækstrate. I laboratoriekulturer kan dette resultere i besværlig akkumulering af oplagsstoffer. |

Tabel 3.2. Egenskaber ved substratudnyttelse hos oligotrofe model-bakterier, og deres tilpasning til disse egenskaber. Efter Hirsch et al. (1979).

| Egenskab | Tilpasning |
|--|---|
| Lav endogen metabolisk aktivitet, hvor energien først og fremmest benyttes til næringsoptagelse. | a) langsom nedbrydning af oplagsnæring og cellebestanddele. b) stor overlevelsessevne uden exogen næringsforsyning. |
| Nettobiosyntesen forøges kun, når både optagelsessystemer og de metaboliske pools er mættede. | Langsom reaktion (nettobiosyntese eller total formering) på næringsforøgelse; oligotrofer vil derfor ikke deltage i den første mikrobielle opformering efter en næringsforøgelse. |
| Biosyntesen vil falde hurtigt ved fald i optagelseshastighed, hvis substratkoncentrationen ikke er tilstrækkelig til at opretholde maksimal transport. | Væksthastigheden bliver ikke holdt vedlige, når exogene næringsstoffer bliver brugt op, men optagelseshastigheden opretholdes og næringsakkumuleringen fortsætter. |
| Katabolisk effektiv og alsidig. | a) rummer mindst gennemsnitlig genetisk kompleksitet. b) vil være oxybiontisk (dvs. kræve ilt). |
| Stor andel af kataboliske enzymer vil være inducible, men carriers vil altid være tilstede. | a) sædvanlig økonomi for specifik proteinsyntese. b) reduktion i mængden af enzymer der er tilgængelige for endogen metabolisme. c) langsom reaktion på forøgelse af tilgængelighed af næring. d) selv med bestående carriers kan lav optagelsesspecificitet påvirke optagelsen af et stof ved relativt overskud af andre. |
| Minimal katabolisk repressión. | Adskillige carbon- og energikilder kan udnyttes samtidigt. |
| Evne til at oplagre mange oplagsstoffer. | a) relativt stor andel af cellens volumen kan optages af oplagring, hvorved kapaciteten for andre aktiviteter reduceres. b) vækst (dvs. balanceret nettobiosyntese) af en velforsynet celle, kan ske selv ved en ubalanceret forøgelse af et enkelt substrat i miljøet. |

Den oligotrofe levevis er tilsyneladende ikke genetisk bestemt, da bakterier, der normalt ikke forventes at vokse ved lave substratkoncentrationer (fx *E. coli* og *Pseudomonas aeruginosa*) kan tilpasse sig lave næringsforhold ved metaboliske og strukturelle ændringer (Kushner, 1980).

3.1. ER GRUNDVANDSBAKTERIERNE OLIGOTROFE ?

Der er mange træk ved den mikrobielle population i grundvandszonen, der tyder på, at den er oligotrof. I flere undersøgelser er der flest bakterier, der vokser frem på næringsfattige (fortyndede) medier (Balkwill & Ghiorse, 1985, Hirsch & Rades-Rohkohl, 1983 og Stetzenback et al., 1985) - se tabel 3.3, hvilket stemmer overens med beskrivelsen af den oligotrofe model-bakterie. Desuden observerede Balkwill & Ghiorse (1985) en forskydning ned gennem jordprofilet så antallet og diversiteten af bakterierne blev mindre på næringsrige medier i større dybder, men steg på næringsfattige medier. Andre (Buchanan-Mappin et al., 1986) fandt ikke flere bakterier på næringsfattige end på næringsrige medier.

Grundvandsbakteriernes morfologi stemmer også overens med den generelle beskrivelse af den oligotrofe model-bakterie, da mange har hårlignende overfladepolymerer ("fimbriae") eller vedhæng ("prostheca") (Hirsch & Rades-Rohkohl, 1983 og Wilson et al. 1983).

Oplagsnæring er også en karakteristisk egenskab hos bakterier, der mangler næringsstoffer, og Poindexter (1981) påpeger, at poly-beta-hydroxybutyrat (PHB) - et lipid - forekommer i oligotrofe bakterier. Det er en fordel for oligotrofe bakterier, at PHB kan dannes og mobiliseres uden direkte brug af ATP. PHB kan optages i f.eks. fosforbegrænsede bakteriekulturer, men under kulstofbegrænsede vækstforhold er der ikke observeret PHB-oplagring (Poindexter & Eley, 1983). PHB akkumuleres også af aerobe eller fakultative anaerobe bakterier, hvis de mangler ilt (Schlegel, 1985). Det relative PHB-indhold i en bakteriepopulation afspejler således dens fysiologiske til-

Tabel 3.3. Effekt af næringsrige og næringsfattige vækstmedier på bakterietællinger (kolonidannende enheder, cfu) på prøver fra 6 meters dybde. Ghiorse & Balkwill (1985).

| Medium | Middel cfu (<u>±</u> s.d.)/g jord (ts.) |
|-------------------------|--|
| PYG (næringsrig) | 6.3 (<u>±</u> 1) $\times 10^2$ |
| 5% PYG (næringsfattig) | 3.1 (<u>±</u> 1.0) $\times 10^6$ |
| 10% SEA (næringsfattig) | 2.5 (<u>±</u> 1.0) $\times 10^6$ |

PYG: Pepton-gærekstrakt-glucose-trypticase (30 g kulstofkilde/l)

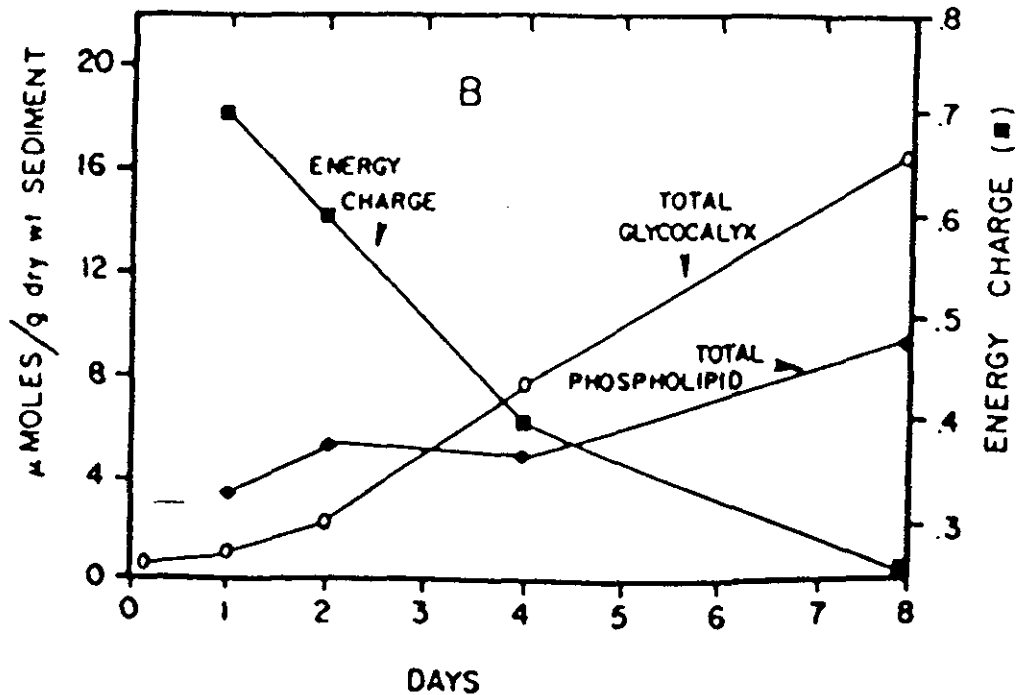
SEA: jordekstrakt.

stand - afhængig af koncentrationen af et eller flere næringsstoffer og iltforholdene.

I mange grundvandsprøver er der fundet et højt indhold af PHB. Ved transmissionselektronmikroskopi er der fundet oplagring af PHB-lignende granula i bakterierne (Ghiorse & Balkwill, 1983 og Wilson et al., 1983), og ved gaschromatografiske analyser af prøverne fandt White et al. (1981, cit i Ghiorse & Balkwill, 1983), at PHB-indholdet per mol muraminsyre (cellevægsstof) var 20 gange højere i prøver fra dybe jordlag end i prøver fra overfladejord. Desuden fandt Smith et al. (1986) at PHB/phospholipid-ratioen var 0.6 i overfladejord, men 9.1 i 4 meters dybde.

Disse undersøgelser viser, at PHB udtrykker populationens metaboliske tilstand, og at den mikrobielle population i grundvandszonen er vækstbegrænset, hvilket er typisk for oligotrofe miljøer.

Et andet mål for den mikrobielle populations metaboliske tilstand er: "adenylate energy charge" (AEC) (Brookes et al., 1983). AEC er forholdet



Figur 3.2. Forholdet mellem glycocalyx-dannelse, adenylat energy charge (AEC) og den cellulære biomasse målt som lipidfosfat, under vækst af *Pseudomonas atlantica* (Uhlinger & White, 1983).

mellem ATP og intracellulær adenosin nucleotid, dvs.:

$$AEC = (ATP + 0.5 \times ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

AEC er i aktivt voksende celler 0.8 - 0.95, og lavere værdier indikerer, at populationen er under stress. Det er således oplagt, at AEC kunne give væsentlige informationer om grundvandsbakteriernes væksttilstand, men endnu er der ikke publiceret resultater fra sådanne undersøgelser.

Afslutningsvis skal det omtales, at hos nogle bakterier kan overfladen være helt dækket af polysaccharider - denne kappe kaldes en "glycocalyx" (Costeron et al. 1978). Dannelsen af glycocalyx er størst i perioder, hvor bakterierne er under metabolisk stress, (hvilket er vist for en marin bakteriestamme (*Pseudomonas atlantica*) i figur 3.2. (Uhlinger & White, 1983)). Det er derfor sjældent, at glycocalyx observeres hos rene bakteriekulturer, da der ikke er nogen selektionsfordel for bakterierne ved at

danne glycocalyx i de næringsrige medier, der sædvanligvis benyttes ved laboratorieforsøg.

Sådanne extracellulære polymere materialer kan forøge bakteriernes mulighed for at hæfte til mineraloverflader, hvor næringsstoffer ofte akkumuleres (Ghiorse & Balkwill, 1983). Glycocalyx kan også opbevare og opkoncentrere enzymer, der er udskilt af bakterierne, samt fungere som føde reservoir, idet næringsioner og molekyler bindes ved hjælp af ionbindinger (Costerton et al. 1978).

Disse egenskaber er navnlig nyttige i næringsfattige miljøer, og Ghiorse & Balkwill (1983) har observeret, at nogle grundvandsbakterier er omgivet af et materiale, der farves med ruthenium rødt, hvilket tolkes som glucocalyx. Hirsch & Rades Rohkohl (1983) har i en undersøgelse af grundvandsbakteriers morfologi fundet, at "mange grundvandsbakterier er dækket af hårlignende overfladepolymerer". Endelig fandt White et al. (1983) i et salint grundvandsmagasin, at forholdet mellem uronsyrer (der er indikator for glycocalyx (White et al. 1983 og Uhlinger & White, 1983) og phospholipid er 13 i estuarint sediment - men 84 i grundvandssediment. Desuden udgjorde kulstofindholdet i glycocalyx 1/3 af grundvandsbakteriernes kulstofindhold.

Glycocalyx kan således forekomme hos bakterier i oligotrofe miljøer, og er observeret hos grundvandsbakterier.

Det kan konkluderes, at grundvandsbakterier er tilpasset det oligotrofe miljø de lever i. Selv om der er visse uoverensstemmelser fx med hensyn til aerobicitet og substratspecificitet, udviser de mange træk, der er karakteristiske for oligotrofe organismer, og træk der viser metabolisk stress.

3.2. OLIGOTROFE BAKTERIERS BETYDNING FOR OMSÆTNING AF MILJØFREMMEDE STOFFER.

En af de egenskaber hos den oligotrofe model-bakterie, der især er interessante i forbindelse med forurening af grundvand, er, at oligotrofe bakterier hele tiden er aktive og ikke går over i hvilestadier. De skal derfor ikke aktiveres, før de kan omsætte nyligt tilførte forurenende stoffer. Desuden er den oligotrofe model-bakterie meget uspecifik mht. substratudnyttelse og har optagelsessystemer med høj substrataffinitet. Dermed optages flere substrater samtidigt og ved lave koncentrationer. Dette kunne betyde, at i hvert fald de forurenende stoffer, der ligner det substrat, bakterierne iøvrigt vokser på, hurtigt skulle kunne omsættes og fjernes til meget lave niveauer.

I nogle tilfælde har det vist sig, at nedbrydningen af miljøfremmede stoffer kun sker indtil en vis nedre tærskelværdi, hvor de stadig kan være skadelige. Dette er fundet for 2,4-D (Boethling & Alexander, 1979), 1,2-diklorbenzen (Bouwer & McCarty, 1984 og Kuhn et al., 1985) og generelt for klorerede benzener (Rittmann, 1980). Et modelarbejde (Schmidt et al., 1985) forudsiger, at tærskelværdien indtræder, når den diffuse flux af substratmolekyler til bakterien balancerer med dens maintenance energi (udtrykt i substratmolekyler), dvs. den energi, cellen skal bruge til at opretholde livsfunktionerne.

På grund af den oligotrofe model-bakteries høje optagelsesaffinitet og kapacitet til samtidigt at optage flere substrater, kan oligotrofe bakterier muligvis medvirke til at fjerne organiske forurenende stoffer i lave koncentrationer (Kobayashi & Rittmann, 1982) og dermed til at sænke tærskelværdierne. Men da den oligotrofe model-bakterie har lav maksimal væksthastighed vil omsætningshastigheden af disse stoffer antageligt være lav. Dette stemmer overens med, at omsætningshastigheden af sukkerstoffer og aminosyrer er meget lavere i prøver fra grundvand end fra overfladejord (Marxsen, 1981) - i samme størrelsesorden som i andre oligotrofe (visse marine og ferske) miljøer (Ventullo & Larson, 1985).

Den høje optagelsesaffinitet hos den oligotrofe model-bakterie kan dog også medføre større følsomhed overfor toksiske stoffer (se tabel 3.1.).

På trods af at den oligotrofe model-bakterie har et relativt stort enzym-potentiale, dvs. at den kan omsætte mange forskellige stoffer, skal disse enzymer ofte induceres. Da oligotrofe bakterier reagerer langsomt på ændringer i substratkoncentrationen (for ikke at spille ressourcer på en kortvarig substratkilde), må der forventes en vis lagperiode før nye organiske substrater bliver omsat.

Imidlertid understøttes denne teori, om at den oligotrofe bakterie har et særligt stort enzym-potentiale, ikke af en sammenligning mellem bakterieisolater fra 3 miljøer (Gehlen et al., 1985). Undersøgelsen viser, at grundvandsbakterier generelt kan omsætte færre af de undersøgte 95 substrater end bakterier fra overfladevand og spildevand. Dette stemmer overens med Ishida & Kadota's (1981) iagttagelser af, at ingen af de undersøgte 18 oligotrofe bakterier, kunne optage hverken acetat, prolin eller leucin og kun ringe mængder glucose, mens glutaminsyre, glycin, serin og glycerolsyre blev optaget. Wilson et al. (1983a) mener også, at grundvandsbakterier (der i denne undersøgelse ikke kunne nedbryde chlorbenzen) kan nedbryde færre stoffer end bakterier fra overfladejord, hvor chlorbenzen nedbrydes.

De foreliggende undersøgelser viser, at den bakterielle population i grundvandszonen er under kraftigt metabolisk stress bl.a. af mangel af næringsstoffer. Der foreligger ingen litteratur om betydningen af dette metaboliske stress i forhold til evnen til at omsætte forurenende stoffer.

4. FASTE OVERFLADERS BETYDNING FOR BAKTERIER I GRUNDVANDSZONEN.

Det er af flere årsager væsentligt at afklare, om den bakterielle population i grundvandsmagasinet er fritlevende eller fasthæftet til partiklerne i grundvandsmagasinet, først og fremmest er det af betydning ved prøvetagningen. Hvis størstedelen af den bakterielle population er associeret eller bundet til faste overflader, vil vandprøver fra grundvandsmagasinet ikke være repræsentative for den totale mikrobielle population og den totale mikrobielle aktivitet.

Dette har navnlig betydning, hvis den bakterielle population skal karakteriseres økofysiologisk, dvs. om en population er i stand til at nedbryde specifikke organiske (evt. forurenende) stoffer under definerede forhold (fx forskellige redox forhold). Hvis populationens artssammensætning eller diversitet ønskes undersøgt, er det ligeledes vigtigt, at alle miljøets organismer er repræsenteret i den undersøgte prøve.

Der kan også være tale om at isolere en bakteriestamme, der er i stand til at omsætte bestemte forurenende stoffer - fx for at opformere denne stamme. I sådanne tilfælde er det vigtigt at vide, om bakterien kræver faste overflader (glaskugler, sand m.m.), for at kunne dyrkes og bevare evnen til at nedbryde det miljøfremmede stof. Således har det vist sig, at en bakteriestamme, der kan nedbryde toluen under anaerobe forhold, kun gør det, hvis der er fx skifergrus i vækstmediet (Zeyer, J. pers. com).

I forsøg med biologisk rensning af kemikalieforurenede grundvand kan der være tale om at anvende bakterier, der er specielt egnede eller adapterede til at nedbryde de specifikke stoffer. For at kunne vurdere mulighederne for at tilføre eller infiltrere sådanne bakterier er det afgørende at vide, om de er fritlevende eller fasthæftede.

4.1. NÆRINGSFORHOLDENES BETYDNING.

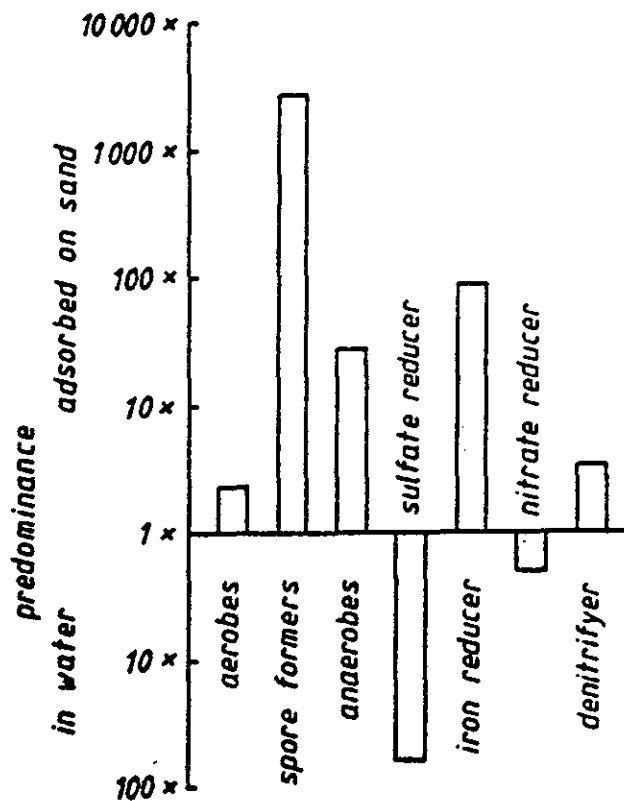
I næringsfattige (oligotrofe) miljøer (Marshall, 1980), er mikroorganismene ofte fasthæftede på overflader, men ved øget substratkonzentration kan en stadig større del af populationen være fritlevende (suspendede).

I et næringsfattigt miljø, hvor en fritlevende mikroorganisme er omgivet af vand med lav substratkonzentration, vil det være en fordel for organismen at være fastsiddende og lade vandet strømme forbi. Herved bliver der større mulighed for, at substratmolekyler rammer mikroorganismen. Desuden vil overflader, der eksponeres for vandige opløsninger, meget hurtigt adsorbere enhver polymer fra opløsningen (Ellwood et al., 1982). Herved bliver næringsforholdene - i hvert fald ved carbonbegrænsede forhold - bedre på overflader end i væsken.

Ellwood et al. (1982) opsummerer en række ældre undersøgelser, der viste, at ved lave substratkonzentrationer var vækstraterne større for de organismer, der var fastsiddende på overflader, end for de, der var i væskefasen. Således kunne *Escherichia coli* kun vokse i et næringsfattigt glucose-pepton-medium (glucose koncentrationen var mindre end 25 mg/l), når der var glaskugler tilstede. *Bacillus subtilis* kunne kun vokse i fortyndede medier ved tilstedeværelse af chitinpartikler. Andre forsøg med beriget havvand viste, at ved meget lave næringskonzentrationer var den bakterielle vækst begrænset til glasoverflader.

Desuden refererer Ellwood et al. (1982) undersøgelser, der viste, at enterobakterier, der var adsorberet til glasoverflader, var mere metabolisk aktive end bakterier i væskefasen. Et andet forsøg med et vidt spektrum af bakterier viste, at ved adsorption til lerpartikler blev respirationsraten forøget. Også *Bacillus subtilis* forøgede respirationsraten ved adsorption til bentonit eller attapulgit.

Det fremgår således af litteraturen, at overflader kan forbedre vækstforholdene for bakterier i laboratorieforsøg. Navnlig ved lave substratkonzentrationer har overfladerne betydning. Jannash & Pritchard (1972, cit. i



Figur 4.1 Fordeling (på volumen basis) mellem bakterier, der er fritlevende og bakterier, der er fasthæftede til partikler, opgjort for forskellige fysiologiske grupper. Undersøgelsen er udført i et kunstigt grundvandsmagasin, der tilføres lossepladsperkolat (Neumeier & Küster, 1987).

Parkers (1982)) finder i batchforsøg med ophobningskulturer fra naturligt havvand, at tilsætning af lerpartikler ingen effekt havde på ilt-optagelsen ved høje carbonkoncentrationer. Ved lave carbonkoncentrationer blev ilt-optagelsen derimod forøget, når der blev tilsat partikler.

Det fremgår af det ovenstående, at i flere forskellige miljøer har partikeloverflader betydning for den mikrobielle population. Desuden er det velkendt, at i miljøer med mange partikler (fx saltmarsk-sediment) er store dele af den bakterielle population associeret til partikeloverflader (Harvey et al. 1984).

Der er derimod kun få arbejder, der har undersøgt disse forhold i grundvand. Harvey et al., (1984) har undersøgt forholdet mellem antallet af fritlevende og fasthæftede bakterier i grundvandszonen (prøvetagningsdybde: 12-32 m), forurennet med sekundært behandlet spildevand. Undersøgelsen viste, at mindre end 5% af den totale population (talt ved AODC) var fritlevende. I en kunstig aquifer: 100 m lang, 1,5 m dyb og 1 m bred, hvor der blev tilført perkolat fra en anaerob losseplads (COD: 2000) med en flowhastighed på 0,3 m/d, undersøgte Neumeir & Küster (1987) forholdet mellem fritlevende og fastsiddende bakterier for en række øko-fysiologiske grupper (se figur 4.1). Bortset fra sulfat- og nitratreducerende bakterier - hvilket forfatterne ikke diskuterer - er de fleste bakterier fasthæftede.

Selv om de to undersøgelser ikke direkte kan sammenlignes, da der er benyttet forskellige metoder til bakterietællingerne (hhv. direkte tællinger og pladespredning på selektive medier) viser resultaterne samme tendens: at de fleste bakterier er fasthæftede. Dette skyldes antageligt de oligotrofe forhold i grundvandszonen, og at næringsforholdene i et sådant miljø er bedre på partiklernes overflade.

4.2. BETYDNINGEN AF PARTIKLERNES STØRRELSE.

Bakterier, der er fasthæftede til partikler i grundvandsmagasinet fordeler sig ikke nødvendigvis ligeligt på de forskellige partikelfraktioner.

I den tidligere omtalte undersøgelse fandt Harvey et al. (1984), at 67% af den totale fasthæftede population fandtes på den mindste partikelfraktion (< 20 µm) se tabel 4.1, som kun udgjorde 1% af sedimentets vægt (men naturligvis en betydelig del af sedimentets overfladeareal). Den største fraktion (> 105 µm), der udgjorde 97% af sedimentets vægt, havde ingen fasthæftede bakterier.

Tabel 4.1. Fordeling af fast materiale fra grundvandsmagasinet og fasthæftede bakterier i fire partikelfraktioner (Harvey et al. 1984).

| Størrelsesfraktion (μm) | Fordeling af partikler (% af den totale masse) | Fordeling af fasthæftede bakterier (% af den totale population) |
|---|---|---|
| < 20 | 0,97 \pm 0,65 | 67,3 \pm 7,6 |
| 20 - 60 | 0,95 \pm 0,66 | 22,8 \pm 5,8 |
| 60 - 105 | 1,03 \pm 0,65 | 9,9 \pm 3,9 |
| > 105 | 97,1 \pm 1,9 | 0 |

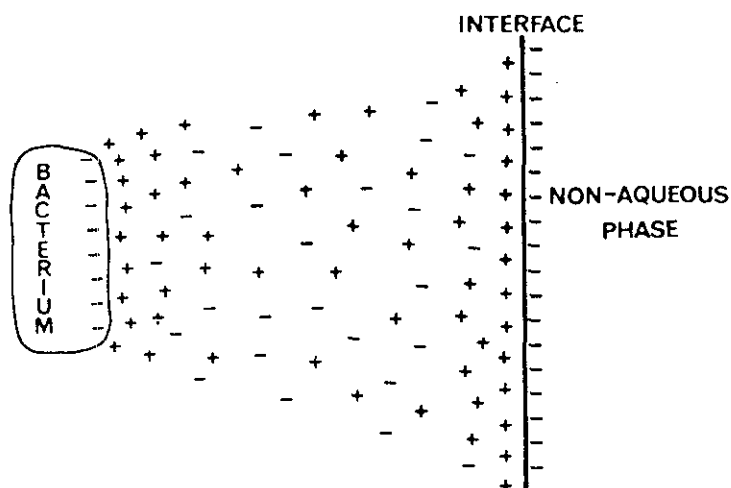
a) Middelværdi og standard deviations af 6 prøver.

4.3. MIKROORGANISMERNES FASTHÆFTNINGSMEKANISMER.

Mikroorganismernes fasthæftning til en overflade kan inddeles i 3 stadier:

1. Adsorption, der er et resultat af fysiske kræfter: London - van der Waals-kræfter (tiltrækkende) og dobbeltlag-elektrostatisk interaktioner (frastødende).
2. Permanent fasthæftning til overfladen, hvilket ofte involverer polymerer, der danner bro mellem de to overflader.
3. Kolonisering af overfladen ved vækst af organismen (Ellwood et al. 1987)

Da mikroorganismer og de fleste partikler (ler- og humuspartikler) er negativt ladede på overfladen, vil der dannes et diffust dobbeltlag af "modioner" (kationer) på begge overflader. Disse skyer af kationer vil virke gensidigt frastødende. Samtidigt er der tiltrækkende kræfter: London-



Figur 4.2. Skematisk fremstilling af samspillet mellem ionskyen omkring en negativt ladet bakterie og ionskyen ved en negativt ladet overflade. (Marshall, 1980).

van der Waalske-kræfter mellem mikroorganismer og overflader. Der vil indstille sig en ligevægt mellem de to sæt kræfter, således at mikroorganismene fastholdes i en vis afstand fra overfladen. Dobbeltlagets tykkelse afhænger imidlertid af væskens salinitet, og ved meget lave saliniteter (5×10^{-45} M for monovalente ioner (NaCl) og 5×10^{-54} M for divalente ioner (MgSO_4)) kan mikroorganismene ikke fastholdes til overfladen. Ved højere saltkoncentrationer sammenpresses det diffuse dobbeltlag, og organismene bindes tættere til overfladen (Marshall, 1980).

Herefter kan der etableres en egentlig binding mellem mikroorganismene og overfladen via polymerer, der udskilles af mikroorganismene - først og fremmest polysaccharider. Bakteriens overflade kan være helt dækket af sådanne polymerer - denne kappe kaldes en "glycocalyx" (Costerton et al. 1978), der er omtalt i foregående kaptitel.

Polysaccharidfibrene er som regel negativt ladede, men kan danne polære bindinger med andre polysaccharider (fx på dyreceller) vha. divalente positive ioner i mediet (Costerton et al. 1978). Lignende mekanismer kan tænkes at have betydning ved binding til faste, negativt ladede overflader.

På trods af den manglende forståelse for processens forløb, har Brannan & Caldwell (1982) opstillet en matematisk model til beskrivelse af bakteriernes kolonisering af overflader.

Som det fremgår, er der ringe viden om, hvordan disse fasthæftnings- og koloniseringsmekanismer virker for mikroorganismer på faste overflader. I en af de nyeste undersøgelser af emnet (i dette tilfælde svampesporers fasthæftning til forskellige overflader) kan Karhoot et al. (1987) kun konkludere, at sandsynligvis har både overfladens natur og det anvendte medium betydning for fasthæftelsen.

4.4. PARTIKELBUNDNE BAKTERIERS BETYDNING FOR NEDBRYDNINGSPOTENTIALET.

Det fremgik af det ovenstående, at i lighed med andre miljøer, hvor partikler dominerer miljøet, er størstedelen af bakterierne i grundvandszonen knyttet til partikler - især de små partikler.

Imidlertid er den metaboliske aktivitet på forskellige partikelfraktioner ikke blevet undersøgt i grundvandszonen. En undersøgelse, der er blevet foretaget i overfladejord, viste, at 58-73% af mikroorganismernes omsætning af organisk stof i jorden blev udført af mikroorganismer, der var knyttet til lerfraktionen (Christensen, 1987). Størstedelen af bakterierne i grundvandsmiljøet er knyttet til små partikler, og det er derfor sandsynligt, at denne fraktion har stor betydning for omsætning af organisk stof - bl.a. nedbrydning af forurenende organiske stoffer. (Harvey et al., 1984).

Det er nødvendigt, også at inddrage hydrogeologien i grundvandsmagasinet ved vurderingen af nedbrydningsforholdene. Det er således blevet fremført, at den hydrauliske ledningsevne af siltfraktionen er flere størrelsesordner lavere end i sandfraktionen. Selv om den fasthæftede biomasse pr volumen er meget større end den fritlevende biomasse, kan den hydrauliske situation bevirke, at den fasthæftede biomasses kvantitative betydning for

nedbrydning af organiske stoffer bliver lille i forhold til de fritlevende bakterier, der kan følge vandet i de større jordporer (Arvin et al., 1987). Dette forudsætter dog at de miljøfremmede stoffer, der ønskes nedbrudt, er i fri opløsning i vandet og ikke adsorberes til sedimentets overflader.

Det er således uafklaret, om den fasthæftede bakteriepopulation, der tilsyneladende er den antalsmæssigt største del, også har størst betydning for den mikrobielle aktivitet. Den fasthæftede og den fritlevende del af bakteriepopulationen er næppe fuldstændigt adskilte, det er muligt, at der sker udvekslinger mellem disse populationer. Den fasthæftede population kunne fungere som "lager" eller "sikkerhedspulje" i forhold til den fritlevende population, idet det store bakterieantal i den fasthæftede population antageligt rummer en større variation, - og dermed potentiale for at kunne nedbryde flere stoffer. Den fritlevende population kan derimod fungere som spredningsmekanisme for den fastsiddende population - hvis den kan transporteres.

5. TRANSPORT AF BAKTERIER I GRUNDEVANDSMAGASINET.

Selv om størstedelen af den bakterielle biomasse i grundvandsmagasiner er fasthæftet, er der også en fritlevende population, og det er et spørgsmål, om denne population også transporteres.

Det er tidligere blevet nævnt, at interessen for grundvand hidtil har været koncentreret om drikkevandskvalitet, navnlig om risikoen for forurening med pathogene (sygdomsfremkaldende) bakterier og virus. Derfor er der gennemført mange undersøgelser om overlevelse og transport af bakterier og virus fra nedsivningsanlæg, septic-tanke mm. I disse undersøgelser er der ofte benyttet indikatorbakterier (først og fremmest *Escherichia coli*) for humant pathogene bakterier.

Ved forureninger fra lossepladser, er den alvorligste trussel mod grundvandet miljøfremmede stoffer - først og fremmest organiske stoffer. Da bakterier er vigtige for nedbrydningen af disse stoffer, er det væsentligt at vide, om de nedbrydende bakterier er opformeret i lossepladsen og perkolatet og derefter transporteret med grundvandsfanen - eller om det uforurenede grundvands bakterier adapteres til disse forurenende stoffer ved fronten af perkolatfanen. Transporthastigheden for bakterierne i perkolatfanen og adaptationstiden for det uforurenede grundvands bakterier bliver dermed vigtige parametre, af betydning for nedbrydningstiden. En lang række andre faktorer (redoxpotentialer, næringssalte osv.) har naturligvis også betydning for nedbrydningstiden.

Foruden passiv transport ned i grundvandsmagasinet, kan bakterier også injiceres direkte gennem en boring. Dette er fx aktuelt, hvor det er forsøgt at kombinere spildevandsrensning og produktion af kunstigt grundvand. Overlevelse og transport af injicerede bakterier har navnlig stor betydning ved vurdering af, om det er muligt at rense et forurenede grundvandsmagasin ved at injicere store mængder af bakterier, der er særligt tilpassede til at nedbryde specifikke forurenende organiske stoffer.

5.1. HİDTİDİGE UNDERSØGELSER.

Det er den generelle opfattelse, at mikroorganismer kun i begrænset omfang transporteres i jord, og at overfladejorden virker som et filter, der opfanger de tilførte mikroorganismer (Hagedorn, 1984).

I en uforstyrret jord (umættet zone) er de væsentligste processer til at tilbageholde bakterier: 1) aktuel filtrering i den faste matrix. 2) sedimentering af bakterier i jordporerne. 3) "clogging", hvorved nyligt frafiltrerede bakterier medvirker til at reducere den effektive porediameter, med en efterfølgende forøgelse af jordens filtervirkning. Flokkulering af bakterier med colloidalt materiale kan også forøge filter- og sedimenteringsegenskaberne. (Krone 1968 cit. i Crane & Moore (1984)). Således opbygges der under septictanke og nedslivningsanlæg en "biologisk måtte" af bakterier, der er adsorberet eller fanget i porene. I denne zone, der kun er få cm tyk, sker der derfor en kraftig reduktion af den nedslivende bakteriepopulation.

Crane & Moore (1984) refererer en undersøgelse, der viste, at 99,9% af både det totale antal bakterier og af enterobakterier kan fjernes fra en spildevandsudledning ved filtrering gennem et overfladelag af fint sand med underliggende lag af groft sand og grus. Imidlertid var en brønd 27 m fra udledningen påvirket af spildevandet, da det totale antal bakterier var $10^5/100$ ml og antallet af fæcale bakterier var $10^2/100$ ml. Der var altså stadig en del bakterier tilbage i det infiltrerede vand. Desuden kan bakterier, der har overlevet transporten gennem den umættede zone, opformerer, hvis vækstforholdene er gode. Der er fx observeret vækst af *E. coli* under infiltrering i grundvand (Goldsmidt, 1974, cit. i Gerba & Bitton, 1984). Hvis disse erfaringer overføres til en forurening fra en losseplads, er det derfor ikke nødvendigvis afgørende, at mange bakterier transporteres med perkolatfanen, blot de er tilpassede substratet, og vækstforholdene er gode.

Det fremgår af tabel 5.1, at bakterier, der er tilført grundvandet, kan overleve i længere perioder - op til 6-7 måneder (i ekstreme tilfælde har

Tabel 5.1. Transportafstande og -tider for forskellige bakterier i jord (efter Crane & Moore (1984) og Gerba (1984)).

| Organisme | Jordtype | Afstand (m) | Tid (uger) | Reference |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------|------------|-------------------------|
| Bacillus coli | fint sand | 19.8 | 27 | Stiles & Crohurst, 1923 |
| Coliforme | - | 70.7 | - | Warrick & Muegge, 1930 |
| Bacillus coli | fint og groft sand | 24.4 | - | Caldwell, 1937 |
| Bacillus coli | sand og sandet ler | 10.7 | 8 | Caldwell & Parr, 1937 |
| Bacillus coli | fint sand | 3.1 | - | Caldwell, 1938 |
| Coliforme | fint sandet silt | 0.6-4 | - | Butler et al., 1954 |
| Coliforme | grundvand | 30 | 0.2 | McGauhey & Krone, 1954 |
| E. coli | sand klit | 3.1 | - | Baars, 1957 |
| Enterococci | - | 15 | - | Fournelle, 1957 |
| Coliforme | sandet grus | 0.9 | - | McMichael & McKee, 1966 |
| Fæcale coliforme og streptococ. | groft grus | 457.2 | 2.1 | Merrell, 1967 |
| Coliforme | sand og ærtegrus grundvand | 30.5 | 0.2 | Krone et al., 1958 |
| Fæcale coliforme | fint og groft sandet grundvand | 30.5 | - | Wesner & Baier, 1970 |
| Coliforme | sand og grus | 830 | - | Ana'ev & Demin, 1971 |
| Bacillus stea- rothermophilis | krystalinsk grundfjeld | 28.7 | 0.15 | Allen & Morrison, 1973 |
| Coliforme | fint-mellem sandet | 6.1 | - | Young, 1973 |
| Fæcale coliforme | finsiltet sand og grus | 9.1 | - | Bower et al., 1974 |
| Total coliforme | fin silt | 6.1 | - | Reneau & Pettry, 1975 |
| Fæcale coliforme | do | 13.5 | - | do |
| Fæcale coliforme og streptococ. | fint siltet sand | 9 | - | Gilbert et al., 1976 |
| Fæcal coliforme | grundvand | 900 | - | Martin & Noonan, 1977 |
| Fæcale streptococcer | siltet sand og grus | 183 | - | Schaub & Sorber, 1977 |
| Pseudomonas sp. | grundvand | 15 | - | Viraraghavan, 1978 |
| Bacillus subtilis | sandet grus | 90 | 0.3 | Marti et al., 1979 |
| Serratia marcescens | do | 90 | 0.07 | do |
| Streptococcus faecalis | do | 90 | 0.07 | do |
| E. coli | siltet ler | 20 | 0.03 | McCoy & Hagedorn, 1979 |
| E. coli | grundvand | 125 | - | Pyle, 1979 |
| Bacillus stea- rothermophilus | alluvialt grundvand | 920 | - | Sinton, 1979 |
| E. coli (H ₂ S+) | do | 920 | - | do |
| E. coli (anti-biotica resis.) | do | 920 | - | do |

pathogene organismer overlevet i 5 år i jord (Gerba & Bitton, 1984)). Det fremgår også af tabellen, at bakterierne kan transporteres over større afstande: typisk 30-40 m. I nogle tilfælde har det vist sig, at bakterier kan transporteres over afstande på 800-900 m. Således observerede Vaisman ((1964) cit. i Crane & Moore (1984)) en massiv bakteriel forurening i en pumpebrønd i et alluvialt, sandet grundvandsmagasin. Forureningen stammede fra en sivebrønd 850 m væk. I dette tilfælde skyldtes den lange transport en kombination af høj horisontal permeabilitet i grundvandsmagasinet og en øget grundvandsstrøm pga. oppumpningen.

5.2. PÅVIRKNING AF BAKTERIETRANSPORT.

Transport af bakterier kan foregå aktivt (fx ved hjælp af flageller) eller passivt (med jordvandet). Generelt kan den aktive mobilitet negligeres, når vandflowet er betragteligt, og Balkwill & Ghiorse (1985) anfører, at mindre end 5% af de undersøgte grundvandsbakterier (elektronmikroskopiske undersøgelser) har flageller.

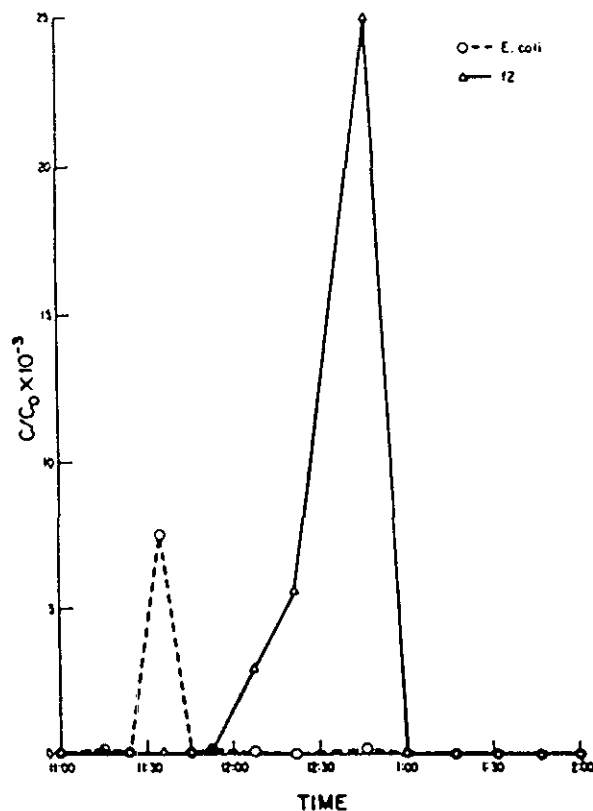
En række faktorer og deres betydning for bakteriers overlevelse og transport, er sammenstillet i tabel 5.2.

En af de væsentligste parametre er jordens vandindhold. Ved lavt vandindhold i jorden (i den umættede zone) bliver bakteriers transport reduceret, fordi transportvejen bliver begrænset til vandfilmen på jordpartikler og i de mindre jordporer. Ved vandindhold under markkapacitet er den mikrobielle transport ubetydelig. Ved højere jordvandspotentialer bliver størstedelen af bakterierne transporteret gennem makroporerne.

Jordens kornstørrelsesfordeling influerer på adsorptionen af bakterier, så der er omvendt proportionalitet mellem partikelstørrelsen og tilbageholdelsen af bakterierne. Som det fremgår af det foregående kapitel, er det især lerpartikler, bakterierne bliver bundet til. Jordens struktur kan også have betydning for transporten af bakterier. I en række forskellige overflade-

Tabel 5.2. Faktorer, der har betydning for bakteriers overlevelse og transport i jord.

| Faktor | Tilstand der øger overlevelse og transport | Bemærkninger |
|---|--|--|
| <u>Organismen</u> | | |
| Fysiologisk tilstand | Lavt stress | |
| Antal/koncentration | Få tilførte bakterier | For fæcale bakterier kan det betyde bedre konkurrenceforhold i fht. substrat. |
| Størrelse | Store bakterier - evt. med indkapsling | De store organismer kan ikke trænge ind i de små porer, dvs. transportvejen bliver mindre. |
| <u>JORDEN</u> | | |
| pH | Neutral | Lav pH nedsætter overlevelsen og øger adsorptionen. |
| Temperatur | Lav, konstant | Frysning og tøning reducerer overlevelsestiden. |
| Ionstyrke | Lav ionstyrke | Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , NH_4^+ , Ca^{2+} øger adsorptionen. |
| Kationer | Få | Anioner har ingen effekt. |
| Vandindhold (mættet/umættet) | Højt vandindhold/mættet | Ved lavt vandindhold/umættet forhold, begrænses transporten til vandfilmen på jordpartiklerne. |
| Organisk stof - konc. og sammensætning | Høj koncentration | Organisk stof øger overlevelsen for fæcale bakterier, der er tilpasset højesubstratkoncentrationer. Konkurrencen om adsorptionspladserne øges, og dermed øges transporten. |
| Næringsalte | | Afhængig af bakterie og næringsalt. |
| Textur | Grove jorde | Jo grovere jord jo større transport. |
| Porøsitet | Makroporer i lerjord | |
| Lerindhold og -type | Lavt lerindhold | Organismerne bindes til lerpartiklerne. |
| <u>BIOLOGISKE INTERAKTIONER MELLEML ORGANISMERNE.</u> | | |
| Konkurrence fra endogen mikroflora | Steril jord | Desuden kan actinomyceter og protozoer nedsætte overlevelsen. |
| Toksiske stoffer | Fravær | Antibiotika nedsætter overlevelsen. |



Figur 5.1. Gennembrudskurve for Escherichia coli og colifagen f2 i et tracerforsøg i grundvand. Organismerne blev tilført kontinuert. Figuren viser koncentrationen (C) i en boring 150 m fra injektionsstedet i forhold til den injicerede koncentration (C_0) (Gerba & Bitton, 1984).

jorde fandt Smith et al. (1985), at intakte, uforstyrrede kerner tilbageholdt 21-78% af de tilførte bakterier (*E. coli*). I forstyrrede jordkerner (blandet, sigtet og pakket) blev der derimod tilbageholdt mindst 93% af de tilførte bakterier, fordi jordens makroporer blev ødelagt ved pakningsproceduren. Sådanne forsøg viser, at resultater, der er opnået i pakkede kolonner, kan være misvisende.

I forsøg med bakterietransport i jordsøjler under mattede flow-forhold (hvor transportforholdene er bedre end under umattede forhold) er der opnået gennembrudskurver for bakterierne, der kan behandles ud fra samme teori som for gel-søjle chromatografi. I sådanne forsøg passerede bakterier søjlen hurtigere end konservative ioner som klorid-ioner. Dette viser, at

den fase, der transporterede bakterierne, var mindre end den samlede vandfase. Dette skyldes, at bakterierne er for store til at trænge ind i de små porer, i modsætning til vandet, og derfor bliver transportvejen for bakterierne kortere (Bitton et al. 1974).

Sådanne gennembrudskurver er også observeret i feltforsøg, bl.a. har Marti et al. (1979) vist, at injicerede indikatorbakterier transporteredes hurtigere end et farvestof, der blev injiceret samtidigt.

Jordens temperatur har også betydning; bakteriernes overlevelse er størst ved lave, konstante temperaturer. Store temperaturudsving, som ved frost og tø, såvel som høje temperaturer, evt kombineret med tørre forhold eller mekaniske påvirkninger, nedsætter henfaldstiden væsentligt. (Crane & Moore 1984).

Ekstreme pH-værdier forkorter også henfaldstiden - navnlig lave pH-værdier har betydning. Der er bedst overlevelsesforhold for bakterierne ved neutralt pH (Crane & Moore, 1984). pH kan også påvirke adsorptionen af bakterierne - retentionen øges ved lave pH-værdier (Gerba & Bitton, 1984)

Som nævnt tidligere er størstedelen af overlevelsesforsøgene udført med fæcale bakterier, dvs. bakterier, der er tilpasset til et miljø med høje substratkoncentrationer. Disse forsøg viser, at øget indhold af organisk stof i jorden forøger overlevelsestiden. Det er muligt, at betydningen af højt indhold af organisk stof kun gælder fæcale og andre bakterier, der er tilvænnet høj substratkoncentration. Hvis konkurrencen om substratet mindskes (Crane & Moore, 1984), f.eks. ved en reduktion af den tilførte bakteriemængde, forøges overlevelsestiden for den restende bakterier.

Opløste organiske stoffer (fx har pepton denne effekt ved laboratorieforsøg (Hendrichs et al. 1979)) i grundvandet kan øge konkurrencen om adsorptionspladser på partiklerne. Når de organiske stoffer optager adsorptionspladserne, bliver færre bakterier adsorberet, men i stedet transporteret med grundvandsstrømmen.

Som det fremgik af foregående kapitel, har jordvæskens ionstyrke betydning

for bakteriernes adsorption - idet adsorptionen forøges samtidig med ionstyrken. Ionsammensætningen har også betydning, idet visse metalliske kationer (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) og ammoniumioner (NH_4^+) forøger adsorptionen af bakterier ved koncentrationer, der er almindelige i jord. Anioner (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) har ingen indflydelse på adsorption (Gerba & Bitton, 1984). Andre divalente kationer (Ca^{2+}) kan også forøge tilbageholdelsen af bakterier (Kott, 1987). Det skal nævnes, at ionstyrken ofte er høj i perkolater fra lossepladser, hvilket derfor kan forventes at øge adsorptionen og nedsætte bakteriernes transport.

Bakteriernes størrelse har også betydning for, hvor hurtigt de transporteres. Bitton et al. (1974) viste, at en stor indkapslet stamme af *Klebsiella aerogenes* blev transporteret hurtigere end en mindre stamme, der ikke var indkapslet. Dette forklaredes ved, at de store celler ikke kunne trænge ind i de små porer, hvorved transportvejen blev kortere, (jf. gel-chromatografi-teorien).

Det imidlertid ikke kun størrelsen, der influerer på transporthastigheden, da der er forskel på, hvorledes bakterier og partikler (fx plastikugler) transporteres. Harvey et al. (1986) undersøgte transporten af carboxylerede mikrokugler i grundvandet til en brønd 1,5 m fra injektionsstedet. Forsøget viste, at de store kugler (1,2 μm) i højere grad blev holdt tilbage end de små (0,7 og 0,2 μm) kugler. Dette viser, at den mekaniske filtrerings-effektivitet er størrelsesafhængig. Forsøget blev gentaget med DAPI-farvede grundvandsbakterier (0,2-1,6 μm), og resultatet var, at transporthastigheden af bakterierne var 100, 149 og 288 gange større end for hhv. 1,2, 0,7 og 0,2 μm mikrokugler. Forfatterne konkluderer, at mobiliteten af nogle bakterier må være lige så stor som for konservative tracere.

Tilstedeværelsen af andre mikroorganismer i jorden kan forkorte overlevelsestiden for enterobakterier, der generelt overlever i længere tid i steril end i usteril jord. Dette kan evt. skyldes, at konkurrencen om de tilgængelige næringsstoffer er mindre. Andre organismer som fx Actinomyceter er istand til (f.eks. vha. antibiotika) at undertrykke vækst af Salmonella- og dysenteribakterier. Protozoers græsning af bakterier kan også nedsætte overlevelsestiden (Gerba & Bitton, 1984).

Der er således mange faktorer, der influerer på bakterietransporten, og det kan derfor være vanskeligt at vurdere den resulterende transporthastighed. Dette er alligevel blevet forsøgt ved udviklingen af matematiske modeller til at beskrive bakteriers transport i grundvand (Corapcioglu & Haridas, 1985) og i porøse medier (Corapcioglu & Haridas, 1984).

5.3. OVERLEVELSE OG TRANSPORT AF BAKTERIER I FORURENET GRUNDVAND.

Der er kun publiceret få undersøgelser af, hvorledes bakterier transporteres i et forurenede grundvandsreservoir.

De fleste af de hidtil omtalte undersøgelser er udført med fæcale bakterier, hvis normale miljø er den humane organisme med høj temperatur og substratkoncentration, og jord og grundvand er fremmede miljøer for disse bakterier. Da organismer, der er tilpasset forureningsfanen eller grundvandsmiljøet ikke udsættes for tilsvarende store ændringer, er det kun med forbehold, konklusionerne fra disse undersøgelser kan overføres til grundvand forurenede fra lossepladser.

Det skal nævnes, at der i lossepladser kan forekomme thermofile, eutrofe mikroorganismer - en eventuel nedsivning til grundvandet vil være en kraftig miljøændring for disse organismer.

Harvey et al. (1986) konstaterede, at bakterier fra et grundvandsmagasin, der efter DAPI-farvning blev injiceret i grundvandet, blev transporteret 1,5 m til en brønd, hvor de kunne genfindes. Nogle af bakterierne blev transporteret næsten lige så hurtigt som uorganiske tracere.

I søjleforsøg med sand fandt Kott (1987), at perkolering med spildevand øgede transporten af indikatorbakterier, i forhold til perkolering med uforurenede vand.

Meer et al. (1987) isolerede en *Pseudomonas*-stamme P51 på 1,2,4-trichlorbenzen fra sediment fra Rhinen. Forsøgene blev udført i en pakket jordkolonne med kontinueret upflow under aerobe, mættede forhold, og ved en temperatur på 20°C. Ved tilførsel af P51 til jordkolonnerne blev nedbrydningen af 1,2,4-TCB kraftigt forøget. Stammen kunne overleve og bevare aktiviteten i mindst 60 døgn. Desuden var P51 mobil i kolonnen: når bakteriestammen blev tilført midt i kolonnen observerede forfatterne efter 42 døgn, at den væsentligste nedbrydningsaktivitet var flyttet til de første 5 cm af kolonnen. Dette fænomen kan efter forfatterens mening bedst beskrives som chemotaxi. Der er tale om aktiv transport, da P51 har bevæget sig mod perkoleringsstrømmen. Forfatterne mener ligeledes, at matematisk modellering i lignende forsøg, hvor nedbrydning af 1,4-DCB blev foretaget af mikroorganismer fra lokaliteten, viser stærke indicier for, at chemotaxi er vigtigt i vandmættede jordsystemer.

I en undersøgelse foretaget af Jain et al. (1987), er det blevet vist, at både bakteriestammer, der er isoleret fra grundvand, og *Pseudomonas putida* med TOL-plasmid (toluen-xylen catabolisme) kunne overleve, når de blev tilført et grundvandsmikrokosmos. Det tilførte TOL-plasmid var stabilt, også uden tilstedeværelse af toluen. Tilførslen af TOL-plasmidet havde dog ingen effekt på nedbrydningen af toluen.

Forsøg på at tilføre grundvandszonen bakterier, der er særligt egnede til at nedbryde olie, har resulteret i en øget nedbrydning - men bakterierne forblev lokaliseret tæt omkring injektionsrøret (Van den Berg, pers. com). Hvad angår bakteriernes egen-mobilitet, er det velkendt, at en række bakterier kan bevæge sig til bedre substrater eller iltforhold (Okon et al., 1980). Det er imidlertid ikke givet, at bakterierne har bevæget sig aktivt. Det er muligt, at der er tale om et vækstfænomen, således at der er flest delinger hos de bakterier, der er nærmest de optimale substratforhold - så bakterierne "gror" hen imod substratkilden (Zeyer, J., pers. kom).

Det kan sammenfattes, at laboratorieforsøg har vist, at bakterier er mobile, hvis der perkoleres med spildevand. Desuden kan bakterier, der kan nedbryde særlige forurenede stoffer, overleve og være aktive i jordsøjler. Feltforsøg har vist, at grundvandsbakterier, der tilføres grundvandsmagasi-

net igen, kan transporteres heri, men også at det er vanskeligt at sprede injicerede olienedbrydende bakterier i grundvandsmagasinet. Alligevel blev olienedbrydningen forøget. Dette antyder, at det muligvis kun er bakterier under dårlige vækstforhold, der er fritlevende og transporteres med grundvandsstrømmen.

5.4. AFSLUTNING.

Det foreliggende datamateriale viser, at den umættede zone danner en ret effektiv barriere mellem jordoverfladen og grundvandet. Denne barriere er som regel tilstrækkelig til at beskytte grundvandet mod bakterieforurening fra nedslivningsanlæg eller septictanke. Barrieren har antageligt også en vis effekt, når det gælder nedslivning af bakterier med perkolat fra lossepladser.

En del lossepladser er placeret i gamle grusgrave eller lignende lokaliteter, hvor afstanden til grundvandet er kort, og hvor den umættede zone er tynd. Desuden er de geologiske aflejringer på disse lokaliteter ofte præget af store kornstørrelser med høj permeabilitet og ringe evne til at tilbageholde bakterier. Da perkolatet har et højt indhold af organisk stof, der kan virke fremmende på overlevelse og transport af bakterierne, og da der er tale om store mængder perkolat, kan det ikke udelukkes, at der sker en mætning af adsorptionssites i jorden, hvorved transporten øges. Det kan derfor ikke udelukkes, at der kan ske en transport af bakterier med perkolatet ned i grundvandet.

De foreliggende data viser også, at når bakterier er nået ned i grundvandet, kan de overleve længe og transporteres langt. Temperaturen i grundvandet er lav og konstant, og pH er ofte neutral, hvilket øger overlevelsestiden. Forurening af grundvandet med lossepladisperkolat ændrer ikke disse forhold. Ionstyrken øges derimod, hvilket øger muligheden for adsorption. Selv om størstedelen af bakterierne i grundvandsmagasinet er fasthæftede, kan det ikke udelukkes, at der sker en vis transport af bakte-

rier (f.eks. med lossepladsperkolat) gennem grundvandsmagasinet.

Desuden har det vist sig, at bakterier, der er isoleret fra grundvandsmiljøet, og som kan nedbryde bestemte miljøfremmede stoffer, kan overleve og bevare nedbrydningsaktiviteten i jordsøjler i længere tid. Det er endog muligt, at bakterierne bevæger sig aktivt hen mod substratet (typisk i fronten af perkolatfanen, hvor næringsalte og elektronacceptorer ikke er opbrugt).

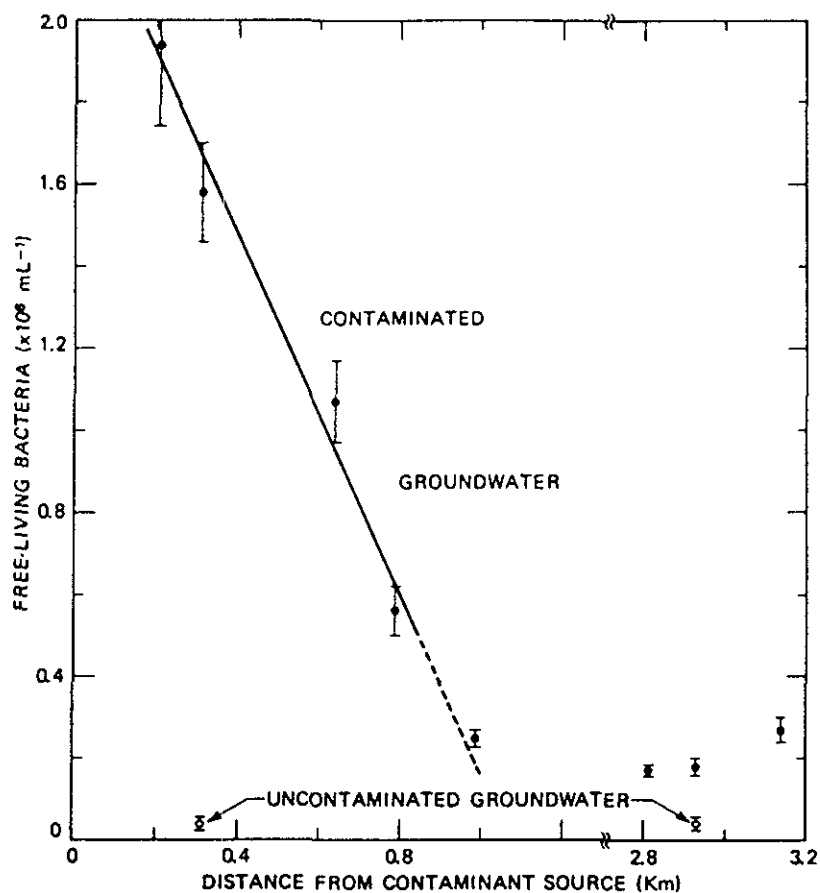
6. EFFEKTER AF ORGANISK FORURENING.

Ved forurening af grundvandszonen, hvad enten forureningen er losseplads-perkolat eller nedsivende kemikalier, forøges indholdet af organiske stoffer, og dermed forbedres substratforholdene for bakterierne. I oligotrofe miljøer - som i uforurenede grundvand - er koncentrationen af energikilder lav og ofte begrænsende for bakteriernes vækst. Selv om nedbrydeligheden af forskellige forureningstyper varierer, er det forventeligt, at det bakterielle samfund påvirkes af en forurening, da miljøet ikke længere er oligotroft.

I dette kapitel vil effekten af organiske forureninger blive belyst mht. påvirkningen af grundvandszonens bakterielle samfunds tæthed, sammensætning og aktivitet.

6.1. EFFEKT PÅ BIOMASSENS STØRRELSE.

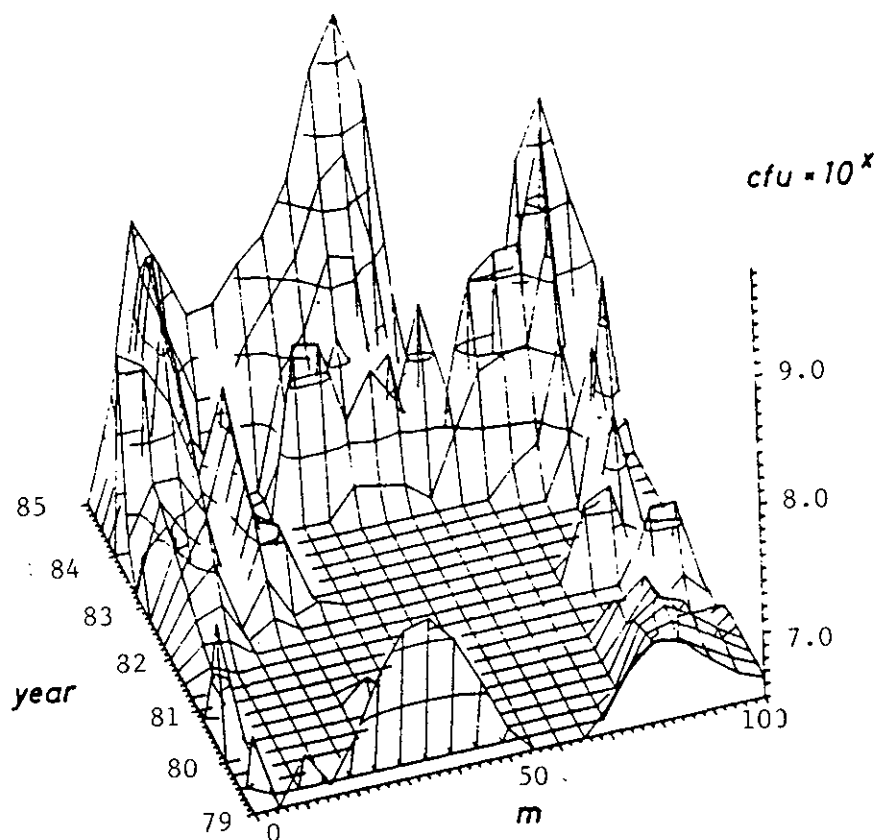
I en undersøgelse af et grundvandsmagasin (5-30 m dybt) nedstrøms (0-1000 m) for et nedsivningsanlæg for spildevand, fandt Harvey et al. (1984), at antallet af bakterier (AODC) faldt med afstanden fra forureningskilden. 200 m fra forureningskilden var der $1,94 (+0,02) \times 10^6$ /ml fritelevende bakterier - men i uforurenede grundvand var der kun $0,04 (+0,005) \times 10^6$ /ml. Nær forureningskilden var der lineær korrelation mellem antallet af fritelevende bakterier og afstanden til forureningskilden (se figur 6.1.). Der var samme tendens (ikke signifikant) for antallet af fastsiddende bakterier. I prøver, der var samlet 2-3 km nedstrøms forureningskilden, var bakterieantallet stadig større end i uforurenede prøver. Der var ikke lineær korrelation mellem afstanden og bakterieantallet så langt fra forureningskilden, hvilket forfatterne tilskrev en mere refraktær sammensætning af det organiske stof i denne del af forureningsfanen.



Figur 6.1. Antal fritlevende bakterier (\pm standard deviation) i forurennet grundvand, som funktion af afstanden fra forureningskilden (spildevands-slambede).

Symboler: fyldte cirkler: prøver fra forurennet grundvand (bestemt vha. ledningsevne), åbne cirkler: prøver fra uforurennet grundvand. Den rette linie viser den lineære regression ($r^2=0.98$ ved $P \leq 0.05$) (Harvey et al., 1984).

Forurening med lossepladsperkolat kan også forøge bakterieantallet. Det er påvist både i kalkaflejringer i 9-30 m dybde, hvor det største bakterieantal blev opgjort til $1,9 \times 10^8$ bakterier/g (t.s.) (direkte mikroskop-tællinger efter farvning med phenol anilinblåt) (Blakey & Towler, 1987), i et anaerobt grundvandsmagasin nær overfladen (Beeman & Suflita, 1987) og i mødelforsøg (Neumeier & Küster, 1987). I det sidstomtalte forsøg, der er udført i et kunstigt grundvandsmagasin, blev bakterieantallet forøget ved tilførsel af perkolat fra en losseplads i det anaerobe stadium - se figur 6.2.



Figur 6.2. Udviklingen i antallet (logaritmisk) af aerobe bakterier (cfu: kolonidannende enheder) i et 100 m langt kunstigt grundvandsmagasin i årene 1979 - 85. (Neumeier & Küster, 1987).

Denne stigning i bakterieantal såvel som i biomasse (totalt ekstraherbart phospholipid og ATP) er også fundet ved andre forureninger - se tabel 6.1.

6.2. EFFEKT PÅ SAMMENSÆTNINGEN AF DET BAKTERIELLE SAMFUND.

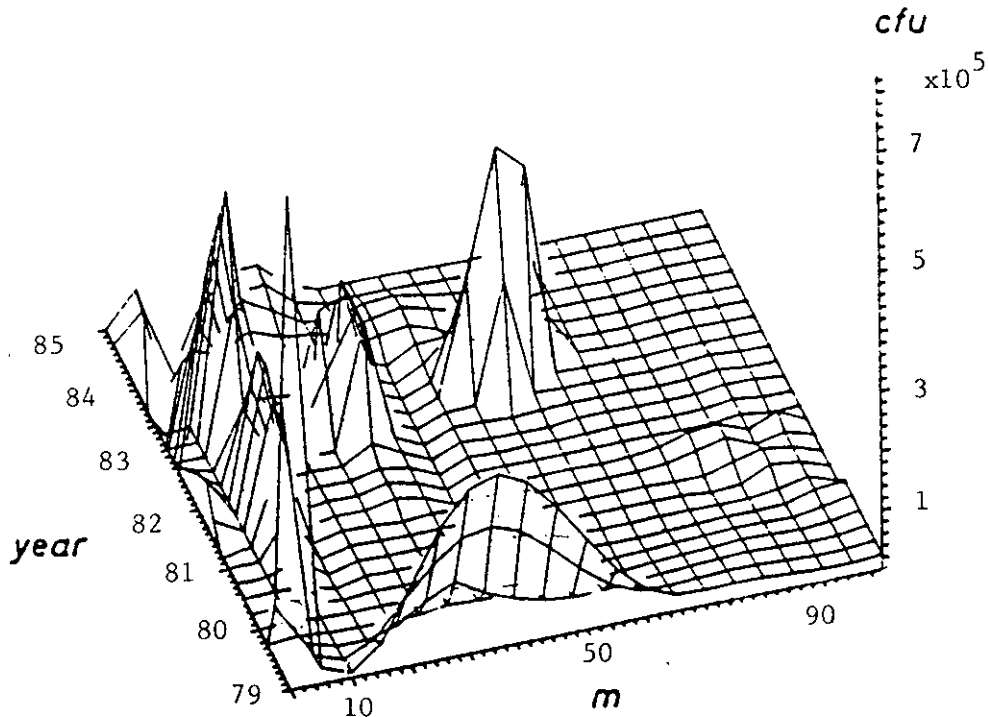
Ved en phenolforurening (creosot-spild) fandt Smith et al. (1986) en forskydning i det bakterielle samfund, idet de grampositive bakterier (målt ved indholdet af glycerol teichon syre) udgjorde en mindre andel i det forurenede end i det uforurenede grundvand. Forfatterne gør opmærksom på, at der er stor variation på disse målinger, men de understøttes af en samtidig stigning i andelen af lipopolysaccharid-lipid A hydroxy fedtsyrer (der er indikator for gram-negative bakterier).

Tabel 6.1. Sammenligning mellem forurenede og uforurenede lokaliteter for forskellige biomassemål.

| Forureningstype | | Uforurennet | Forurennet | Reference |
|---|---|-------------|------------|---------------------------------|
| Direkte tællinger (acredin orange) ($\times 10^6$ /ml eller $\times 10^6$ /g t.s.) | | | | |
| Olie | V | 0,07 | 0,33-2,2 | Aamand & Jørgensen (in prep) |
| Creosot | V | 1-10 | 0.07-20 | Ehrlich et al. (1983) |
| Nedsivende spildevand | V | 0,040 | 1,94 | Harvey et al. (1984) |
| Organisk stof | V | 2,0-3,7 | 3,6-11 | Marxsen (1981) |
| Septictank | V | 0,04-0,06 | 0,14-1,21 | Ventullo & Larson (1985) |
| Creosote (phenoler) | S | 1,2-16 | 8 | Webster et al. (1985) |
| Totalekstraherbar phospholipid (nmol phospholipid/ g t.s.) | | | | |
| Creosot-spild (phenoler) | | 0,6 | 1,9 | Smith et al (1986) |
| ATP (ng ATP/g t.s.) | | | | |
| Creosot-spild (phenoler) | | 0,02 | 0,37 | Wilson et al. (1986) |
| do. svagt forurennet | | 0,02 | 0,008 | Webster et al. (1985) |

V: vandprøve, S: sedimentprøve.

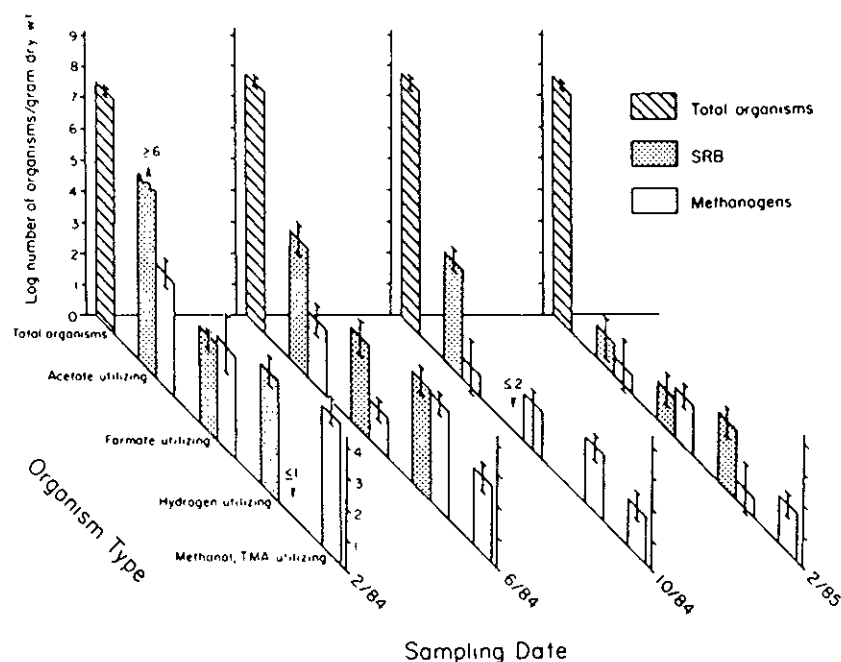
Det er også blevet påvist, at bakteriernes størrelse kan ændres ved en forurening. Ved en forurening af nedsivende sekundært behandlet spildevand var bakterielængden 0.5 um nær kilden, men længere fra kilden (1.6 km.) var



Figur 6.3. Udviklingen i antallet af anaerobe bakterier (cfu: kolonidannende enheder) i et 100 m langt kunstigt grundvandsmagasin i årene 1979-85. (Neumeier & Küster, 1987)

bakterierne 0.9 μm (Harvey & George, 1986). Dette er i modstrid med, at der er fundet større bakterieceller i olieforurenede grundvand end i et nærliggende upåvirket grundvandsmagasin (Aamand & Jørgensen 1987). Denne stigning kan skyldes at miljøet ændres fra at være oligotroft, til at være mere næringsrigt. Faldet i bakteriestørrelsen i en perkolatfane forklares ved transportfænomener (Harvey & George, 1986).

Forskydningerne mellem bakteriepopulationens øko-fysiologiske grupper ved en forurening med losseplads perkolat (fra en losseplads i den anaerob fase) er blevet undersøgt i et kunstigt grundvandsmagasin (100 m langt, 1,5 m højt) (Neumeier & Küster, 1987). Det er navnlig i de første 5-10 m, at der er anaerobe bakterier - se figur 6.3.



Figur 6.4. Fordelingen af det totale bakterieantal (AODC) og forskellige fysiologiske grupper af sulfatreducerende bakterier (SRB) i et anoxisk grundvandsmagasin under en losseplads (Beeman & Suflita, 1987).

Dette skyldes, at den bakterielle aktivitet bliver forøget ved tilførsel af organisk materiale, hvorved ilten forbruges. Den anaerobe population udgør imidlertid mindre end 1% af den aerobe bakteriepopulation. I figur 6.4. er der vist, hvorledes det bakterieantal (AODC) og forskellige fysiologiske grupper af sulfatreducerende bakterier fordeler sig i et anoxisk grundvandsmagasin under en losseplads.

I zonen, hvor der er flest anaerobe bakterier er det fysiologiske grupper som methanogene og sulfat- og jernreducerende bakterier, der kræver anaerobe forhold, der forekommer tættest på indløbet. Herefter erstattes de obligat anaerobe bakterier af fakultative anaerobe bakterier som fx nitratreducerende bakterier. Der er således en succession af forskellige fysiologiske grupper langs gradienten fra forureningskilden.

Antallet af bakterier, der kan nedbryde aromatiske forbindelser, varierer noget, men øges generelt med afstanden fra forureningskilden (Neumeier & Küster, 1987). Dette kan skyldes, at de lettest nedbrydelige fraktioner i

Tabel 6.2. Antal bakterier i forskellige økofysiologiske grupper i grundvandsprøver fra en uforurennet og en creosotforurennet lokalitet. (Ehrlich et al. 1983).

| Direkte tælling (AODC) x10 ⁶ /ml | MPN | | | | | |
|--|-------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | Aerobe pr. ml. | Anaerobe pr. ml. | Denitri- ficerende pr. ml. | Jernre- ducerende pr. ml. | Sulfatre- ducerende pr. ml. | Metha- nogene pr. ml. |
| Uforurennet | | | | | | |
| 1 - 10 | 40- 2000 | 0,2- 90 | 0,2- 0,9 | 0,9-10 | <0,04 | <0,03-0,15 |
| Forurennet | | | | | | |
| 0,07-20 | 9-40.000 | 0,2-400 | 0,2-40 | 0,2-40 | <0,03 | <0,03-2,4 |

perkolat (fede syrer osv.) først nedbrydes, hvorved aromatiske forbindelser kan udgøre en stigende andel af det resterende substrat.

Ehrlich et al. (1983) fandt en forøgelse af antallet fra forskellige økofysiologiske grupper ved en creosot-forurening sammenlignet med en uforurennet lokalitet (se tabel 6.2.). I alle grupperne var der flere bakterier i prøverne fra den forurenede lokalitet, og forureningen har derfor ikke i dette tilfælde forårsaget større forskydninger i populationens sammensætning af øko-fysiologiske grupper.

6.3. EFFEKT PÅ MIKROBIEL AKTIVITET.

Ved organiske forureninger forøges ikke alene bakterieantallet i grundvandszonen - også den mikrobielle aktivitet forøges.

Således fandt Harvey et al. (1984), at i grundvandsprøver, der var berigede med ^3H -glucose (5 μM), var optagelsesraten 35,9 nM glucose/d i prøver 640 m fra et nedsivningsanlæg for spildevand, men faldt til 10,6 nM glucose/d i prøver 1,8 km fra kilden. For at korrigere for bakterieantallet beregnedes den specifikke optagelsesrate (dvs. optagelse pr bakterie), der faldt ved øget organisk forurening. Den specifikke optagelsesrate var $2,47 \times 10^{-17}$ mol glucose/(bakterie dag) 640 m fra kilden og $3,36 \times 10^{-17}$ mol glucose/(bakterie dag) 1,8 km fra kilden. Dette fald kan enten skyldes, som forfatterne angiver, at bakterieantallet er bestemt ved direkte tælling (AODC), hvorved der kan være blevet talt ikke-aktive bakterier, eller at den oprindelige, oligotrofe bakteriepopulation, der har større specifik optagelsesrate, dominerer den svagt forurenede prøve.

En anden undersøgelse (Marxen 1981), hvor den heterotrofe aktivitet blev målt i grundvandsprøver (3,4-4,5 m dybde), viste også en stigende optagelsesrate ved øget belastning med organisk stof (COD: 0,8-1,7 mg O_2/l). I modsætning til overstående undersøgelse var det specifikke optagelsespotentiale (V_{max}/B_n) størst i det forurenede område: $1,3-1,9 \times 10^{-17}$ mol glucose/(bakterie dag). I det svagt belastede område var det specifikke optagelsespotentiale lavere ($0,4 \times 10^{-17}$ mol glucose/(bakterie dag)). De lave værdier i den uforurenede prøve kan i flg. forfatterne skyldes, at relativt mange bakterier er inaktive - pga. den lave in situ-substratkoncentration.

Det fremgår af det foranstående, at biomassen forøges ved en forurening, derimod er det ikke givet, at aktiviteten også forøges. Forureningen kan derimod have en hæmmende eller toksisk effekt - enten pga. tungmetaller, eller pga. toksiske organiske stoffer. Som eksempel kunne færre end 1 o/oo af en podet bakteriemængde vokse, når de blev podet på et medium, der indeholdt 50% forurenat grundvand. Grundvandet var forurenat med bl.a. chlorerede alifater, toluen, xylen, phenol og cyclohexanol. Der var ingen bakterier, der kunne vokse på mediet, hvis vandet udgjorde 80%. (Hoppenheidt & Hanert, 1986).

Da organiske forureninger kan hæmme den bakterielle aktivitet, kan dette i nogle tilfælde være årsagen til, at grundvandsmagasiner med en stærk orga-

nisk forurening er aerob, på trods af at det ville være forventeligt, at ilten blev opbrugt samtidigt med, at substratet blev omsat (Zeyer, J. pers. com.).

Ved en kraftig forurening med organisk stof vil balancen mellem kulstof og uorganiske næringssalte (NPK) forskydes. Dette kan føre til, at væksten bliver begrænset af mangel på uorganiske næringssalte.

Bakteriernes "energi-status" kan forbedres ved forurening med phenolholdigt spildevand (creosot-spild). Smith et al. (1986) har undersøgt forholdet mellem inkorporering af ^{14}C -acetat i phospholipidfedtsyrer (PLFA) og polyhydroxy butyrat (PHB). Da bakterierne kan akkumulere PHB under ubalanceret vækst (fx i et oligotroft miljø), vil PLFA/PHB-rationen være lav under sådanne forhold. I denne undersøgelse var PLFA/PHB-rationen 16 på den uforurenede lokalitet, men 29 og 22 på hhv. en forurenede og meget forurenede lokalitet.

Generationstiden i bakteriepopulationen påvirkes også af organisk forurening. Således øges generationstiden (bestemt vha. frekvensen af delende celler) fra <13h (300 m fra kilden) til 180h 1,6 km fra kilden (Harvey & George, 1986).

6.4. EFFEKT PÅ NEDBRYDNINGSPOTENTIALE FOR MILJØFREMMEDE STOFFER.

En forurening kan, som det fremgår af det foregående, ændre den samlede metaboliske aktivitet i grundvandsmagasinet. Bakteriepopulationens kapacitet til at nedbryde miljøfremmede stoffer kan også ændres ved forureninger.

Det vil ofte være ønskeligt at kunne estimere nedbrydningspotentialet eller -raten for disse stoffer, fx for at bedømme hvilken risiko eksisterende forurenede lokaliteter udgør, dvs. hvor meget forureningen bliver spredt, før den bliver nedbrudt, eller for at vælge den bedste rensningsmetode. En af de mest anvendte metoder er mikrokosmostudier (fx Bengtson, 1985), men

de er besværlige, tidskrævende og dyre. Det ville derfor være ønskeligt, hvis der kunne findes parametre, der kunne benyttes som indikatorer for den mikrobielle populations nedbrydningspotentialer.

Wilson et al. (1986) foreslår at benytte ATP som en sådan indikator, da de finder at toluennedbrydning i grundvand falder med faldende ATP-indhold. Når indholdet er mindre end 0,05 ng ATP/g jord, sker der ikke længere nogen nedbrydning og ATP-indholdet falder ikke yderligere. Denne undersøgelse er kun baseret på to lokaliteter, og forholdet mellem ATP-indholdet i grundvandsmagasinet og nedbrydningspotentialer for miljøfremmede stoffer er derfor dårligt underbygget. Det er i det hele taget tvivlsomt, om der eksisterer en indikator for nedbrydningspotentialer, da en lang række forhold, som endnu ikke er velundersøgte, kan influere på nedbrydningen. Under alle omstændigheder er det naturligvis altid en forudsætning for mikrobiel nedbrydning, at der er aktive mikroorganismer tilstede.

En række miljøfremmede organiske stoffer kan nedbrydes mikrobielt, hvilket er behandlet i fx Jensen et al. (1987) og Kobayashi & Rittmann, (1982). Foruden nedbrydelighed af de enkelte stoffer har andre faktorer betydning for nedbrydningshastigheden og -graden. I nogle tilfælde starter nedbrydningen først efter et stykke tid (lag-fase), men lag-fasens længde kan forkortes og nedbrydningshastigheden forøges, når den mikrobielle population er tilpasset (adapteret) til det givne stof (fx Shimp & Pfaender, 1987). Dette kan betyde, at der ikke er nogen nedbrydning af fx polynucleare aromatiske hydrocarboner (PAH) i uforurenede grundvand, men at en trediedel af det tilsatte PAH nedbrydes inden en uge i grundvandsediment fra en creosotforurenede lokalitet (Wilson et al. 1985).

I andre tilfælde påvirkes nedbrydningen af tilstedeværelsen af andre stoffer (fx kan glucose hæmme phenolnedbrydning (Rozich & Colvin, 1986). Dette diskuteres af Klint og Hessel-Andersen (1987).

Selv om det ofte vil være mangel på elektronacceptorer (ilt, nitrat) eller uorganiske næringssalte (N,P,K,S), der er begrænsende for nedbrydningen af en forurening, kan de øvrige nævnte forhold spille ind, hvilket gør problemstillingen mere kompleks.

6.5. ANVENDELSE AF BAKTERIER TIL RENSNINGER AF GRUNDVAND FORURENET MED ORGANISKE STOFFER.

Der er udført enkelte in situ-rensninger, hvor vækstforholdene for bakterierne i det forurenede grundvandsmagasin er blevet optimeret ved tilførsel af næringssalte og ilt (Werner, 1985). Disse in situ-metoder er opsamlet i en række reviews (Ward & Lee, 1985, Lee & Ward, 1985, Heyse et al., 1986 og Lee et al., 1987).

Desuden er der forsøg igang, der undersøger, hvorvidt gensplejsede bakterier eller bakterier, der er særligt adapterede til at nedbryde bestemte organiske stoffer, kan overleve og bevare deres nedbrydende evne i grundvand. Jain et al. (1987) har vist, at bakterier med TOL-plasmid (toluen - xylen omsætning) kan overleve i et grundvandsmikrokosmos. Selv om TOL-plasmidet var stabilt, kunne der kun påvises effekt på nedbrydningen af styren, men hverken på nedbrydningen af toluen eller chlorbenzen.

In situ-rensninger vha. mikrobiel nedbrydning er således meget nyt, men sandsynligvis ligger de største muligheder for effektive in situ-rensninger i at optimere forholdene for den eksisterende bakteriepopulation.

Dette må ske ud fra en forståelse af de mikrobielle processer i grundvandszonen, da det mikrobielle samfund her er selvstændigt og så forskelligt fra overjordens, at det ikke uden videre er muligt at overføre resultater fra forsøg i overjord til grundvandszonen.

7. KONKLUSION.

Det fremgår af denne rapport, at der kun foreligger begrænset viden om mikrobiologi i grundvandszonen. Dette skyldes tildels, at der først de senere år er blevet større interesse for grundvandet - efter at drikkevandsressourcen trues af kemikalie- og nitratforureninger. Men også metodiske problemer har begrænset forskningen i dette miljø: det er vanskeligt og dyrt at få repræsentative og uforstyrrede prøver fra dybere jordlag. Dette har resulteret i, at der oftest kun er blevet undersøgt vandprøver, da disse er nemmest at udtage. Desuden har forskningsfeltet hidtil været styret af en interesse for det producerede drikkevand i højere grad end drikkevandsressourcen, hvilket har betydet, at der kun har været fokuseret på, om det, der er blevet pumpet op, er forurenet eller ej (både med hensyn til bakterier og kemikalier). Med den stigende belastning af drikkevandsressourcen er det imidlertid nødvendigt at have kendskab til, hvilke processer der foregår i forurenet grundvand - og da den største del af nedbrydningen af forurenende stoffer forestås af bakterier, er det navnlig disse organismer, der må fokuseres på.

Nyere undersøgelser tyder på, at det ikke er tilstrækkeligt at undersøge vandprøver, hvis der skal undersøges mikrobielle omsætningsprocesser i grundvandszonen. Dette skyldes først og fremmest, at størstedelen af bakterierne er fasthæftede til mineralpartiklernes overflader. Muligvis adsorberes organiske stoffer også til mineraloverfladerne, hvilket forbedrer næringsforholdene for bakterierne i det oligotrofe miljø. Da den fasthæftede population er størst, er det muligt, at den har større variation i enzympotentialitet (og dermed større mulighed for at omsætte forurenende stoffer) end den fritlevende og fungerer som puffer-lager for denne population. De fritlevende bakterier har dermed en spredningsfunktion for populationen, da de har størst mulighed for at blive transporteret. Selv om transporten af bakterier er begrænset i jord (navnlig i den umættede zone) kan det ikke afvises, at bakterier kan transporteres i grundvandszonen fx med nedsivende perkolat.

Sammensætningen af bakteriepopulationen og forholdet mellem fasthæftede og

fritlevende bakterier kan antagelig ændres under en forureningssituation.

Ikke alene er prøvetagningen vanskelig - da prøverne skal sikres mod kontaminering fra andre jordlag - men der mangler også anvendelige metoder til at karakterisere den aktive mikrobiologiske population. Der er udført en del biomassebestemmelser og identifikationer af bakterier (om end i meget begrænset omfang i sedimentprøver), men dette udtrykker ikke noget om, hvorvidt organismerne er aktive. På den anden side er der også udført en del målinger af aktivitetspotentialer, der viser, hvor høj aktiviteten kan være under optimale forhold - men ikke hvor stor den er under de aktuelle forhold.

Da bakterierne i grundvandsmiljøet ofte er begrænset af mangel på næringsstoffer og energikilder (oligotrofe forhold), er det muligt, at et større kendskab til deres metaboliske energistatus kan medvirke til at karakterisere den mikrobielle population - også i forhold til dens tilpasningsevne til forurenende stoffer.

I forbindelse med forureninger er der behov for at kunne bestemme den mikrobielle populations nedbrydningspotentialer, dens aktuelle fysiologiske tilstand samt hvilke faktorer, der er begrænsende for nedbrydningen. Disse kan være, at populationen ikke umiddelbart har enzymer, der kan nedbryde stoffet, at stofferne er toksiske, eller at der er mangel på næringsalte eller elektronacceptorer. Et større kendskab til de økologiske forhold, der styrer carbon- og elektronflow i dette miljø, kan bidrage til at afklare disse forhold.

Grundvandsmiljøet som økologisk system er endnu udforsket. Da det er konstateret, at dette økosystem rummer en bakterieflora, der tilsyneladende er særligt tilpasset hertil - og adskilt fra overfladejordens populationer - kan resultater fra andre miljøer ikke uden videre overføres til grundvandsmiljøet. Der er derfor behov for et større kendskab til det uforurenede grundvandssystem (hvad lever disse bakterier af? hvor lever de? hvor følsomme er de for ændringer i miljøet? osv.), for at kunne sammenholde det med andre miljøer og vurdere effekterne af en forurening.

8. REFERENCER.

- Aamand, J. & C. Jørgensen. (1987).** Microbial adaptation to degradation of hydrocarbons in polluted and unpolluted ground water. Submitted to J. Contaminant Hydrology.
- Arvin, E., B. Jensen, J. Aamand & C. Jørgensen. (1987).** The potential of free-living ground water bacteria to degrade aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. International Symposium on Ground water Microbiology: problems and biological treatment. Kuopio, Finland, 4-6 August, 1987.
- Alexander, M. (1977).** Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons. New York.
- Balkwill, D.L. & W.C. Ghiorse. (1985).** Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. Appl. Environ. Microbiol. 50 (3), 580-588.
- Beeman, R.E. & J.M. Suflita. (1987).** Microbial ecology of a shallow unconfined ground water aquifer polluted by municipal landfill leachate. Microb. Ecol. 14 (1), 39-54.
- Bengtsson, G. (1985).** Microcosm for ground water research; Ward, C.H., W. Giger, P.L. McCarty (eds). Ground Water Quality. 330-345, John Wiley & Sons. New York.
- Bitton, G., N. Lahav & Henis, Y. (1974).** Movement and retention of *Klebsiella aerogenes* in soil columns. Plant and Soil, 40, 373-380.
- Blakey, N.C. & P.A. Towler. (1987).** The effect of unsaturated/saturated zone property upon the hydrogeochemical and microbiological processes involved in the migration and attenuation of landfill leachate components. International symposium on groundwater microbiology; problems and biological treatment. Kuopio, Finland, 4-6 august 1987.
- Boethling, R.S. & M. Alexander. (1979).** Microbial degradation of organic compounds at trace levels. Environ. Sci. Technol. 13, 989-991.
- Bonde, G.J. (1985).** Bacteriological characteristics of ground water resources. Aqua 1, 21-26.
- Brannan, D.K. & D.E. Caldwell. (1982).** Evaluation of a proposed surface colonization equation using *Thermothrix thiopara* as a model organism. Microb. Ecol. 8, 15-21.
- Brookes, P.C., K.R. Tate & D.S. Jenkinson. (1983).** The adenylate energy change of the soil microbial biomass. Soil Biol. Biochem. 15, 9-16.

- Buchanan-Mappin, J.M. & P.M. Wallis & A.G. Buchanan. (1986).** Enumeration and identification of heterotrophic bacteria in groundwater and in a mountain stream. Can. J. Microbiol. 32, 93-98.
- Corapcioglu, M.Y. & A. Haridas. (1985).** Microbial transport in soils and groundwater: a numerical model. Adv. Water Res. 8 (4), 188-200.
- Costerton, J.W., G.G. Geesey & K.J. Cheng. (1978).** How bacteria stick. Sci. Am. 238, 86-95.
- Christensen, B.T. (1987).** Decomposability of organic matter in particle size fractions from field soils with straw incorporation. Soil Biol. Biochem. 9 (4), 429-437.
- Crane, S.R. & J.A. Moore. (1984).** Bacteria pollution of groundwater: A review Water, Air and Soil Pollution 22, 67-83.
- Daumas, S., R. Lombart & A. Bianchi. (1986).** A bacteriological study of geothermal spring waters dating from the Dogger and Trias period in the Paris Basin, France. J. Geomicrobiol. 4 (4), 423-433.
- Dott, W., C. Frank, P. Kaempfer, G.J. Tuschewitzki & F. Wernicke. (1986).** Mikrobiologie des grund- und trinkwassers. Zbl. Bakt. Hyg. B. 182, 449-477.
- Dott, W., G. J. Tuschewitzki & E. Thofern. (1982).** Methylo-trophe bakterien im trinkwasserbereich. 2. Mitteilung: Biochemisch/physiologische und morphologische charakterisierung der isolate. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 176, 189-201.
- Ehrlich, G.G., E.M. Godsy, Goerlitz, D.F. & M.F. Hult. (1983).** Microbial ecology of a creosote-contaminated aquifer at St. Louis Park, Minnesota. Dev. Ind. Microbiol. 4, 235-247.
- Ellwood, D.C., C.W. Keevil, P.D. Marsh, C.M. Brown & J.N. Wardell. (1982).** Surface-associated growth. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 297, 517-532.
- Federle, T.W. In press.** Microbial distribution in soil - new techniques. Proceedings of the 4th International Symposium on Microbial Ecology, Ljubljana, Yugoslavia Aug. 23-30, 1986.
- Federle, T.W., D.C. Dobbins, J.R. Thornton-Manning, D.D. Jones. (1986).** Microbial biomass, activity, and community structure in subsurface soils. Ground Water 24 (3), 365-374.
- Freeze, R.A. & J.A. Cherry. (1979).** Groundwater. Prentice Hall, New Jersey.
- Gehlen, M., H.J. Trampisch & W. Dott. (1985).** Physiological characterization of heterotrophic bacterial communities from selected aquatic environments. Microb. Ecol. 11, 205-219.

- Gehron, M.J., J.D. Davis, G.A. Smith & D.C. White. (1984). Determination of the gram-positive content of soils and sediments by analysis of teichoic acid components. J. Microbiol. Methods 2, 165-176.
- Gerba, C.P. & G. Bitton. (1984). Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater. Bitton, G. & C.P. Gerba (eds). Groundwater Pollution Microbiology. Kap. 4: 66-89. John Wiley & Sons. New York.
- Ghiorse, W.C. & D.L. Balkwill. (1983). Enumeration and morphological characterization of bacteria indigenous to subsurface environments. Dev. Ind. Microbiol. 24, 213-224.
- Ghiorse, W.C. & D.L. Balkwill. (1985). Microbiological characterization of subsurface environments. Ward, C.H., W. Giger & P.H. McCarty (eds), Groundwater Quality. 387-401. John Wiley & Sons. York.
- Hagedorn, C. (1984). Microbial aspects of ground water pollution due to septic tanks. Bitton, G. & C.P. Gerba (eds), Groundwater pollution microbiology. 181-195. John Wiley & Sons. New York.
- Harvey, R.W. & L.W. George. (1986). Population dynamics of free-living bacteria in an organically-contaminated aquifer. Molz, F.J., J.W. Mercer & J.T. Wilson (eds). American Geophysical Union. Chapman conference on microbial processes in the transport, fate, and in situ treatment of subsurface contaminants. Oct. 1-3, 1986. Snowbird Resort, Snowbird. UTAH.
- Harvey, R.W., L.H. George, R.L. Smith, D.R. Leblanc, S. Garabedian. (1986). Transport of fluorescent microspheres and DAPI-stained bacteria through a freshwater aquifer. Molz, F.J., J. W. Mercer & J.T. Wilson (eds). American Geophysical Union. Chapman conference on microbial processes in the transport, fate, and in situ treatment of subsurface contaminants. Oct. 1-3, 1986. Snowbird Resort, Snowbird. Utah.
- Harvey, R.H., R.L. Smith & L. George. (1984). Effects of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 48 (6), 1197-1202.
- Hendricks, D.W., F.J. Post & D.R. Khairnar. (1979). Adsorption of bacteria on soils: experiments, thermodynamic rationale, and applications. Water, Air and Soil Pollut. 12, 219-232.
- Heyse, E., S.C. James & R. Wetzel. (1986). In situ aerobic biodegradation of aquifer contaminants at Kelly Air Force Base. Environmental Progress 5 (3), 207-211.
- Hirsch, P., M. Bernhard, S.S. Cohen, J.C. Ensign, H.W. Jannasch, A.L. Kock, K.C. Marshall, A. Matin, J.S. Poindexter, S.E. Rittenberg, D.C. Smith & H. Veldkamp. (1979). Life under conditions of low nutrient concentrations. Group Report. Shilo, M. (ed): Strategies of Microbial Life in Extreme

- Environments. Dahlem Konferenzen, 1978. 357-372. Verlag Chemie, Weinheim.
- Hirsch, P. & E. Rades-Rohkohl. (1983).** Microbial diversity in a groundwater aquifer in northern Germany. Dev. Ind. Microbiol. 24, 183-200.
- Hoppenheidt, K. & H.H. Hanert. (1986).** Untersuchung zur biologischen reinigung eines organisch hoch kontaminierten grundwassers (CKW, Aromaten, aliphaten) in einer labor-beleuchtungsanlage. 167-175. Boden sanierung und altstandorten. 24.-25. September, 1986, Braunschweig. Kurz referate. Zentrum für Abfallforschung, Technische Universität, Carola-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Hussong, D., R.R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R.M. Weiner & W.D. Burge. (1987).** Viable Legionella pneumophila not detectable by culture on agar media. Bio/Technology 5, 947-950.
- Ishida, Y. & H. Kadota. (1981).** Growth patterns and substrate requirements of natural occurring obligate oligotrophs. Microb. Ecol. 7, 123-130.
- Jain, R., G.S. Sayler, J.T. Wilson, L. Houston & D. Pacia. (1987).** Maintenance and stability of introduced genotypes in groundwater aquifer material. Appl. Environ. Microbiol. 53 (5), 996-1002.
- Jensen, S.K., M. Nielsen, H. Riber & J. Skaarup. (1987).** Nedbrydelighed af miljøfremmede stoffer. Lossepladsprojektet, København.
- Jensen, V. (1963).** Studies on the microflora of danish beech forest soils. III Properties and composition of the bacterial flora. Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene. II Abt. 116, 593-611.
- Karhoot, J.M., J.G. Anderson & J.A. Blain. (1987).** Production of Penicillin by immobilized films of Penicillium chrysogenum. Biotechnology Letters 9 (7), 471-474.
- Klint, M. & H. Hessel-Andersen. (1987).** Mikrobiel nedbrydning af miljøfremmede stoffer i relation til grundvandsforurening. Specialerapport. Afd. f. Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.
- Kobayashi, H. & B.E. Rittmann. (1982).** Microbial removal of hazardous organic compounds. Environ. Sci. Technol. 16, 170-183.
- Kott, Y. (1987).** Movement and survival of bacteria in porous media. International Symposium on groundwater microbiology; Problems and biological treatment. 4-6 Aug. 1897. Kuopio, Finland.

- Kuhn, E.P., P.J. Colberg, J.L. Schnoor, O. Wanner, A.J.B. Zehnder & R.P. Schwarzenbach. (1985). Microbial transformation of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies. Environ. Sci. Technol. 19, 961-968.
- Kushner, D.J. (1980). Extreme Environments. Ellwood D.C., J.N. Hedger, M.J. Latham & J.M. Lynch. (eds). Contemporary Microbial Ecology, 29-55. Academic press, London.
- Kuznetsov, S.I., G.A. Dubinia & N.A. Lapteva. (1979). Biology of oligotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33, 377-389.
- Ladd, T.I, R.M. Ventullo, P.M. Wallis & J.W. Costerton. (1982). Heterotrophic activity and biodegradation of labile and refractory compounds by groundwater and stream microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 44, 321-329.
- Leach, F.R. (1984). Biochemical indicators of groundwater pollution. Bitton, G. & C.P. Gerba (eds). Groundwater pollution microbiology. 303-351. John Wiley & Sons. New York.
- Lee, M.D. & C.H. Ward. (1985). Biological methods for the restoration of contaminated aquifers. Environ. Toxicol. Chem. 4, 743-750.
- Lee, M.D., J.T. Wilson & C.H. Ward. (1987). In situ restoration techniques for aquifers contaminated with hazardous wastes. J. Hazardous Materials 14 (1), 71-82.
- Marshall, K.C. (1980). Reactions of microorganisms, ions and macromolecules at interfaces. Ellwood, D.C., J.N. Hedger, M.J. Latham, J.M. Lynch & J.H. Slater (eds): Contemporary microbial ecology: 93-107. Academic Press, London.
- Marti, F., G.D. Valle, M. Krech, R.A. Gees, E. Baumgrat. (1979). Makierversuche in grundwasser mit farbe, bakterien und viren. Alimenta 18, 135-145.
- Marxsen, J. (1981). Bacterial biomass and bacterial uptake of glucose in polluted and unpolluted groundwater of sandy and gravelly deposits. Verh. Internat. Verein. Limnol. 21, 1371-75.
- Matthiesen, L. & L.B. Christensen. (1985). Mikrobiel nedbrydning i grundvand - med naphthalen som modelstof. Specialerapport. Afd. f. Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.
- Meer, V.D., J.R., W. Roelofsen, G. Schraa & A.J.B. Zehnder. Draft. Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4 - trichlorobenzenes by Pseudomonas sp. strain p51 in nonsterile soil columns.
- Neumeier, W. & E. Küster. (1987). The microflora of model groundwater aquifers contaminated with trickling water from land-

fills. International Symposium on Groundwater Microbiology; Problems and Biological treatment. Kuopio, Finland 4-6 august, 1987.

- Okon, Y., L. Cakmakci, I. Nur & I. Chet. (1980).** Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasiliense*: A note. Microb. Ecol. 6, 277-280.
- Parkers, R.J. (1982).** Methods for enriching, isolation, and analysing microbial communities in laboratory systems. ; Bull, A.T. & J.H. Slater (eds) 1982. Microbial interactions and communities Vol 1, p. 45-102. Academic Press, London.
- Poindexter, J.S. (1981).** Oligotrophy, fast and famine existence. Adv. Microbi. Ecol. 5, 63-89.
- Poindexter, J.S. & L.F. Eley. (1983).** Combined procedure for assays of Poly-beta-hydroxy-butyric acid and inorganic polyphosphate. J. Microbiol. Methods 1, 1-17.
- Rittman, B.E., E.J. Bouwer, J.E. Schreiner & P.J. McCarty. (1980).** Biodegradation of trace organic compounds in ground water systems. Technical Report No 255. Dept of Civil Engineering. Stanford University.
- Rozich, A.F. & R.J. Colvin. (1986).** Effects of glucose on phenol degradation by heterogeneous populations. Biotechnol. Bioengineering, 28, 965-971.
- Schlegel, H.G. (1985).** General Microbiology. 6th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Seppänen, H. (1987).** Biological treatment of groundwater in basins with floating filters. II The role of microbes in floating filter. Int. Symp. on Ground water Microbiology: Problems and biological treatment, Kuopio, Finland 4-6 august 1987.
- Shimp, R.J. & F.K. Pfaender. (1987).** Effect of adaptation to phenol on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 53 (7), 1496-1499.
- Sinclair, J.L. & W.C. Ghiorse. (1987).** Distribution of protozoa in subsurface sediments of a pristine groundwater study site in Oklahoma. Appl. Environ. Microbiol. 53 (5), 1157-1163.
- Smith, G.A., J.S. Nickels, B.D. Kerger, J.D. Davis, S.P. Collins, J.T. Wilson, J.F. McNabb & D.C. White. (1986).** Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in subsurface material: a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. Can. J. Microbiol. 32, 104-111.
- Smith, M.S., G.W. Thomas, R.E. White & D. Ritonga. (1985).** Trans-

port of *Escherichia coli* through intact and disturbed soil columns. J. Environ. Qual. 14 (1), 87-91.

Schmidt, S.K., M. Alexander & M.L. Shuler, (1985). Predicting threshold concentrations of organic substrates for bacterial growth. J. Theor. Biol. 114, 1-18.

Stetzenbach, L., L.M. Kelly & N.A. Sinclair, (1986). Isolation, identification and growth of well-water bacteria. Groundwater, 24 (1), 6-10.

Ventullo, R.M. & R.J. Larson, (1985). Metabolic diversity and activity of heterotrophic bacteria in ground water. Environ. Toxicol. Chem. 4, 759-771.

Waksman, S.A. (1916). Bakterial numbers in soil, at different depths, and in different seasons of the year. Soil Science, 1, 363-380.

Ward, T.E. (1985). Characterizing the aerobic and anaerobic microbial activities in surface and subsurface soils. Environ. Toxicol. Chem. 4, 727-737.

Ward, C.H. & M.D. Lee. (1985). In situ technologies. Canter, L.W. & R.C. Knox (eds): Ground Water Pollution Control. 127-156. Lewis Publishers, Inc.

Webster, J., G.J. Hampton, J.T. Wilson, W.C. Ghiorse & F.R. Leach. (1985). Determination of microbial cell numbers in subsurface samples. Ground Water, 23, 17-25.

White, D.C., G.A. Smith, M.J. Ghebron, J.H. Parker, R.H. Findlay, R.F. Martz & H.L. Frederickson. (1983). The groundwater aquifer microbiota: Biomass, community structure, and nutritional status. Dev. Ind. Microbiol. 24, 201-210.

Wilson, J.T., J.F. McNabb, D.L. Balkwill & W.C. Ghiorse. (1983). Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. Groundwater 21 (2), 134-142.

Wilson, J.T., J.F. McNabb, B.H. Wilson & M.J. Noonan. (1983). Biotransformation of selected organic pollutants in groundwater. Dev. Ind. Microbiol. 24, 225-233.

Wilson, J.T., G.D. Miller, W.C. Ghiorse & F.R. Leach. (1986). Relationship between ATP content of subsurface material and the rate of biodegradation of alkylbenzenes and chlorobenzenes. J. contaminant Hydrology 1, 163-170.

Wolters, N. & W. Schwartz. (1956). Untersuchungen über vorkommen und verhalten von mikroorganismen in reinen grundwassern. Arch. f. Hydrobiol. 51 (4), 500-541.

9. ORDLISTE.

Adaptation: Tilpasning, ofte benyttet som udtryk for, om en given adapteret bakteriepopulation kan omsætte bestemte stoffer hurtigere efter at have været udsat for dem tidligere.

AEC: Adenylate Energy Charge. Forholdet mellem ATP og den totale mængde intracellulær adenosin nucleotid. Dette forhold er et udtryk for cellernes metaboliske tilstand.

Aerobe organismer: Organismer, der kan leve ved tilstedeværelse af ilt.

Anaerobe organismer: Organismer, der kan leve uden tilstedeværelse af ilt.

AODC: Acredin Orange Direct Counting. Efter farvning med et fluorescerende stof (acredin orange) tælles bakterierne i en prøve ved mikroskopi.

ATP: Adenosin-5'-triphosphat - energibærende stof i levende celler. Mængden af ATP viser dermed den aktive del af en given population.

Batchforsøg: Forsøg i lukkede beholdere, hvor der ikke tilføres stoffer under forsøget, hvorfor startbetingelserne er afgørende. Under forsøget kan koncentrationen af forskellige stoffer ændres - energikilder kan opbruges, og affaldsstoffer kan ophobes. Modsætning til kemostatforsøg, hvor koncentrationen af nogle stoffer holdes konstant.

Catabolisme: Metabolisk (enzymatisk) nedbrydning.

Chemotaxi: Bakteriers aktive transport (bevægelse) langs en koncentrationsgradient - enten henimod stoffet eller væk fra det.

Cis-vaccenin syre: Indikator for anaerobe bakteriers tilstedeværelse.

Cfu: Colony Forming Units, antal bakterier, der tælles ved pladespredning.

DAPI: 4'-DiAmino-2-PhenylIndol. Fluorescerende stof, der bindes til DNA, hvorefter de blå fluorescerende celler kan tælles mikroskopisk.

DOC: Diluted Organic Carbon - opløst organisk kulstof.

EM.: Elektronmikroskopi.

FDA-hydrolyse: Metode, hvor metabolisk aktive celler spalter acetat fra Fluorescein Diacetat. Herved bliver stoffer grønt og kan måles spektrofotometrisk.

Fæcale bakterier: Bakterier, der stammer fra tarmfloraen - fx i forbindelse med forurening fra septic-tanke.

Glycerol teichonsyre: Indikatorstof for grampositive bakterier.

Glycocalyx: Kappe af polysaccharider omkring bakterier, der menes at have betydning for fasthæftelse og næringsoptagelse i oligotrofe miljøer.

Gram-positiv /-negativ. Klassisk bakteriologisk farvemethode for vægstoffer i bakterier. Benyttes ofte som første kriterie ved identifikation.

Heterotrof: Livsform, hvor organismerne får kulstof og energi fra organiske stoffer.

INT: 2-(p-Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)-5-phenylTetrazolium chlorid. Stof, der af aktive cellers enzymer (respirationskæden) kan reduceres til røde INT-formazan korn, der oplagres i cellerne. Herved kan metabolisk aktive celler tælles mikroskopisk.

Lipopolysaccharid-lipid A-hydroxyfedtsyre: Indikatorstof for gramnegative bakterier.

Mikroökaryoter: Mikroskopiske organismer med cellekerne (fx gær- og mikrosvampe).

Morfologi: Form, her benyttet om bakteriernes ydre form.

MPN: Most Probable Number. Metode til bestemmelse af bakterieantal. Den givne prøve fortyndes og hver fortynding podes i flere replika. Ud fra fordelingen af positive udfald (vækst, respiration, nedbrydning el.lign.) bestemmes bakterieantallet statistisk.

Muraminsyre: Bestanddel i bakteriernes cellevæg - forskelligt i grampositive og -negative bakteriestammer.

Mættet zone: Grundvandszonen, dvs. under grundvandsspejlet, hvor alle porer er vandfyldte.

Nalidixin syre: Stof, der hindrer DNA-syntese og dermed celledeling, uden at cellernes vækst iøvrigt påvirkes. Efter inkubering af en prøve, der er tilsat stoffet, er metabolisk aktive celler meget større end de inaktive og kan tælle mikroskopisk.

Oligocarbofile: Livsform tilpasset lave substratkoncentrationer, hvor det er kulstof, der er begrænsende.

Oligotrophi: Livsform tilpasset lave substratkoncentrationer.

Pathogen: Sygdomsfremkaldende.

PHB: Poly-beta-hydroxybutyrat. Stof der kan oplagres i bakterier, når de bliver begrænset i deres vækst fx ved mangel på kulstof.

Pladespredning: Klassisk mikrobiologisk teknik, hvor en given prøve suspenderes, fortyndes og spredes på et sterilt vækstsubstrat (agar). De enkelte bakterier vokser frem og danner hver en koloni. Bakterieantallet i den oprindelige prøve kan bestemmes ved at tælle antallet af kolonier og korrigere for fortyndingen.

PLFA: Phosphorlipidfedtsyre (se også phosphorlipider).

Phosphorlipider: Forbindelser i bakteriers cellevæg. Koncentrationen af disse stoffer i en given prøve kan bestemmes vha gaschromatografi og benyttes som mål for prøvens biomasse.

Substrataffinitet: Udtryk for, hvor effektivt substrat kan optages. Høj substrataffinitet betyder, at organismen kan optage det givne substrat selv ved lave koncentrationer (dvs. lav k_m).

TOC: Total Organic Carbon - totalt organisk kulstof.

Umættet zone: Jordlag over grundvandsspejlet, hvor alle porer ikke er vandfyldte - dvs. at der også er luft i porerne.

Uronsyre: Indikatorstof for glycoalyx.

Appendix 1.

Oversigt over metoder til bestemmelse af biomasse, metodernes princip og komplikationer (Leach, 1984)

| Method | Basis | Complications |
|-------------------------------------|---|--|
| Growth | | |
| Plate count | Growth to form a visible colony | Media and conditions of incubation are selective. |
| Microscopic | | |
| Epifluorescence | Nucleic acid or protein staining. | Subjective visual measurement. Unable to differentiate dead, moribund, viable, and growing cells. |
| Epifluorescence for dividing cells | Cells with visible septum | Subjective visual measurement and recognition of a small structure. |
| Epifluorescence with nalidixic acid | Nalidixic acid inhibits DNA synthesis but cell increases in size | Visual observation. Not all organisms are susceptible to nalidixic acid. |
| Immunochemical staining | Antibody to specific organisms react | Visual observation. Strain differences in reactivity. |
| Metabolic staining | A specific reaction such as oxidation deposits a substance that can be visually detected | Visual observation. Permeability of the cell to the acceptor. |
| Metabolic | | |
| Fumigation | Kill most organisms and the cellular material that remains is used first as substrates by the remaining cells | Different metabolic capabilities of the organisms. |
| Respiration | Measurement of gas | Substrate specificity and transport specificity. |
| Radioisotope incorporation | Measure biosynthesis | Variation in rates, pool sizes, and transport ability. |
| Bioluminescence | Measure the integrity of the light producing system in bioluminescent bacteria | Measures a physiological response that has a range of sensitivities depending upon the substance that is inhibiting. |
| Enzymatic activity | Enzymatic assay | The enzyme content varies with the conditions of the organism and the available substrates. |

Appendix 1.

| Method | Basis | Complications |
|--------------------------|---|--|
| | | To be differentiative special substrates are used and this produces all the usual problems of specificity. |
| Impedimetric | Electrical measurement during growth | Ionizable salts interfere. Growth is required. |
| Calorimetric | Heat output during metabolism | Selective media. Growth required. Selective medium and substrate utilization. |
| Components | | |
| Uronic acids | Chemical | Extracellular product and not proportional to growth. |
| Muramic acid | Enzymatic or chemical | Present in dead bacteria. Enzyme not specific. Amount varies with organism. |
| LPS | <i>Limulus</i> amoebocyte lysate coagulation | Indicative of gram-negative organisms only. |
| Lipids | Chemical analysis after extraction | Do not rapidly turnover in the environment. Some found lipid phosphate to be nonspecific biomass indicator like ATP. |
| β -Hydroxybutyrate | Chemical | A storage compound and the amount varies depending upon conditions. Reflects metabolic state. |
| ATP | Light production by firefly luciferase or chemical | Amount varies between organisms and metabolic states. |
| Energy charge | Enzymatic determination of ATP, ADP, AMP, or chemical | Requires a rapid quench. Measures metabolic state. |
| Nucleic acids | Fluorimetric | Variation in content. |
| Iron porphyrins | Luminol chemiluminescence | Metal ion interference. |
| Fecal sterols | Chemical | Not necessarily correlated with bacterial numbers. |

UDGIVNE RAPPORTER

I forbindelse med LOSSEPLADSPROJEKTET er med denne rapport i alt udgivet følgende rapporter:

NEDERYDELIGHED AF MILJØFREMMEDE ORGANISKE STOFFER, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH (Rapport U1, 105 sider), oktober 1987. ISEN 87-503-7017-0.

EN REGIONAL GEOLOGISK MODEL FOR OMRÅDET VED VEJEN, Institut for Teknisk Geologi, DTH (Rapport H0-1, 20 sider), december 1987. ISEN 87-503-7079-0.

FORURENEDE INDUSTRIGRUNDE, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH (Rapport U2, 130 sider), januar 1988, ISEN 87-503-7081-2.

GRUNDVANDZONENS MIKROBIOLOGI, Afdelingen for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet (Rapport P6-1, 80 sider), januar 1988, ISEN 87-503-7118-5.

ISBN nr. 87-503-7118-5
Tekst og Tryk. Vedbæk
Pris kr. 40,00 i. m.