

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 20 1999

Biologisk rensning af dieselolieforurennet jord

Fase 1

Bioventingforsøg udført under simulerede in-situ betingelser

Kristian Kirkebjerg og Pia Winther, Carl Bro as
Peter Westermann og Jacob Møller,
Københavns Universitet. Afdelingen for Generel Mikrobiologi
Bente Lund, Teknologisk Institut. Miljø. Sektion for Bioteknik

Indholdsfortegnelse

1	Forord	3
2	Sammendrag	4
3	Introduktion	6
3.1	Projektbeskrivelse	6
3.2	Præsentation af de problemer, der undersøges i projektet	6
4	Baggrundsmateriale/Erfaringer fra tidligere undersøgelser	8
4.1	Tilsætning af adapterede mikroorganismer - starterkulturer	8
4.2	Opformering og spredning	9
4.3	Mikrobiel transport og vedhæftning i jord	11
4.4	Systemer til bioventing og spredning af næringssalte og bakterier	13
5	For-forsøg	16
5.1	Valg af iltkilde	16
5.2	Isolering af bakterier	17
5.2.1	Isolering af olienedbrydende bakterier vha. berigelses-kulturer	17
5.2.2	Batch-forsøg: Tilsætning af en olienedbrydende renkultur til dieselolieforurenede jord	18
5.2.3	Udvælgelse af en olienedbrydende renkultur til brug i containerforsøget	21
5.2.4	Metoder til at detektere olienedbrydende bakterier i jord	21
5.3	Opformering af bakterier	23
6	Containerforsøg	26
6.1	Jordmateriale	26
6.2	Containeropbygning	26
6.2.1	Opbygning af containeranlægget	27
6.2.2	Tilsætning af næringssalte	30
6.2.3	Strategi for inokulering med bakterier	31
6.3	Forsøgsstrategi	32
6.4	Analysemetoder	33
6.4.1	Prøvetagning og behandling af jordprøver	33
6.4.2	Bestemmelse af dieselolieindhold	34
6.4.3	Tælling af heterotrofe og olienedbrydende bakterier	34
6.4.4	Bestemmelse af nitrat og fosfat	34
6.4.5	Bestemmelse af pH og vandindhold	34
7	Resultater af containerforsøg; diskussion	35
7.1	Resultater af uorganiske analyser	35
7.2	Nedbrydning af dieselolie	41
7.3	Biologisk nedbrydning vurderet ud fra resultaterne af respirationstestene	52
7.4	Sammenligning og vurdering af forsøgsresultaterne	60

8	Fremtidige aspekter	63
8.1	Økonomiske betragtninger og driftsteknik i forbindelse med bioventing	63
8.2	Berigelseskultur til nedbrydning af UCM	64
8.3	Fase 2 - opskalering til in-situ forhold	64
9	Konklusion	66
	Referencer	67
	Appendikser	74

1 Forord

Nærværende projekt er udført af Carl Bro a|s i samarbejde med Københavns Universitet, Afdeling for Generel Mikrobiologi, og Dansk Teknologisk Institut, Afdelingen for Bioteknik.

Projektet har modtaget midler fra EEC-NORSPA programmet på kontrakt nr. 92/DK/007 og fra Miljøstyrelsen. De resterende omkostninger er finansieret af de involverede parter.

Denne tekniske rapport omhandler resultaterne fra fase 1 af NORSPA-kontrakten og er udarbejdet til brug for både EU og Miljøstyrelsen som dokumentation for det udførte arbejde.

Det er blevet besluttet, at den tekniske rapport skal omhandle relevante detaljer uden at give fuld dokumentation for alt udført arbejde. Såfremt der er interesse for yderligere detaljer om projektet, kan deltagerne kontaktes.

Vi ønsker specielt at takke Statoil Inc. for assistance med at skaffe jord til projektet.

Kristian Kirkebjerg, Carl Bro Miljø as
Pia Winther, Carl Bro Miljø as
Peter Westermann, Københavns Universitet
Jacob Møller, Københavns Universitet
Bente Lund, Dansk Teknologisk Institut

2 Sammendrag

Der blev udført eksperimenter til undersøgelse af muligheden for at fremme biologisk nedbrydning af dieselolie i sandjord fra den umættede zone under simulerede in-situ betingelser. Jorden blev underkastet forskellige behandlinger - bioventing dvs. beluftning, tilsætning af næringssalte og inokulering med en bakteriel renkultur, som var i stand til at nedbryde dieselolie. De eksperimentelle betingelser blev valgt således, at de lå så tæt på naturligt forekommende forhold som muligt.

For at simulere in-situ forhold, blev dieselolieforurenede jord (dieselolieindhold ca. 2000 mg/kg jord) opgravet og anbragt i to 20 m³ containere, som hver var delt i tre rum. Hvert rum modtog 6 m³ forurenede jord. De eksperimentelle betingelser i de forskellige rum var som følger: Ét forblev ubehandlet, ét blev udelukkende beluftet, to blev beluftet og tilsat næringssalte og to blev beluftet og tilsat næringssalte og olienedbrydende bakterier.

Bioventingsystemet bestod af to perforerede lodrette borer - en injektionsboring og en vakuumboring - pr. containerrum. Beluftningen blev udført vha. diskontinuerlig luftinjektion svarende til 0,36 porevolumen/time. Ilt- og kuldioxidniveauet i jord-luften blev kontinuerligt overvåget vha. 24 prober. Beluftningen blev lukket ned to gange under eksperimentet, og nedbrydningshastigheder for dieselolie blev beregnet på baggrund af respirationsdata for iltforbrug og kuldioxidproduktion.

Den olienedbrydende bakteriekultur, der blev brugt til inokulering, blev opdyrket i en 50 l fermentor og tilsat i vandig opløsning til forsøgsjordens overflade, hvorefter vandet recirkuleredes for at fremme spredningen af bakterierne. Inokulumstørrelsen var $1,9 \times 10^7$ CFU/g jord. Næringssalte i form af nitrat og fosfat blev tilsat af to omgange i vandig opløsning, således at C:N:P-forholdet blev 120:10:1.

Nedbrydning af dieselolie skete til en vis udstrækning i alle containerrum. I de beluftede rum, som også blev tilsat næringssalte, foregik nedbrydningen hurtigt i de første 30 døgn, hvorefter nedbrydningshastigheden faldt, således at ca. 20 % af det oprindelige dieselolieindhold var tilbage efter 112 døgn. Den laveste dieseloliekoncentration, der blev målt i disse rum, var 251 mg/kg jord. Tilsætning af olienedbrydende bakterier fremmede ikke nedbrydningen yderligere, idet tilnærmelsesvis den samme dieseloliekoncentration opnåedes efter 112 døgn i beluftede containerrum, hvor der var blevet tilsat næringssalte. I et af de inokulerede rum inhiberedes nedbrydningen til en vis grad i de første 37 døgn, hvorefter nedbrydningen tog fart. Ca. 1.600 mg dieselolie/kg jord blev nedbrudt i disse rum. Nedbrydning i det rum, som kun blev beluftet, var langsommere og endte med, at 60% af den oprindelige dieseloliekoncentration var tilbage. Et tilsvarende mønster sås i det ubehandlede containerrum.

Chromatografiske data viste, at sammensætningen af olien blev forandret i de containerrum, hvor betydelig nedbrydning skete. Ved forsøgsperiodens udløb var de ligekædede alkaner forsvundet, og dieselolien forekom udelukkende i form af UCM.

De totale antal af heterotrofe bakterier samt antallet af olienedbrydende bakterier faldt langsomt under forsøgsperioden, selvom biologisk nedbrydning fandt sted.

Nedbrydningshastigheder for dieselolie blev beregnet ud fra henholdsvis nedbrydningsdata og respirationsdata: Nedbrydningsdata fra de indledende 19 døgn viste, at den højeste nedbrydningshastighed på 74 mg dieselolie/kg jord/dag fandtes i de beluftede containerrum, som blev tilsat næringssalte. Hvor bakterier blev tilsat, var hastigheden 46 mg dieselolie/kg jord/dag. Beluftning alene gav en hastighed på 27 mg dieselolie/kg jord/dag. På grund af variationen af data, bør disse hastigheder fortolkes med forsigtighed. Beregninger af de samme hastigheder, men udført på grundlag af respirationsdata (iltforbrug) gav en nedbrydning på henholdsvis 32, 20 og 8 mg dieselolie/kg jord/dag. Grunden til forskellen mellem nedbrydningsdata og respirationsdata er ikke klarlagt. Den lavere nedbrydningsrate tilskrives faldende temperatur og øget andel af sværere nedbrydelige forbindelser i olien. Nedbrydningshastigheder beregnet ud fra kuldioxidproduktionen var generelt en faktor to mindre end hastigheder beregnet ud fra iltoptagelsen.

To respirationstests i hhv. september og oktober gav beregnet ud fra iltforbrug lavere nedbrydningshastigheder. Den højeste hastighed i september var 1,8 mg dieselolie/kg jord/dag i de beluftede containerrum, som blev tilsat næringssalte og bakterier, og den laveste var 0,19 mg dieselolie/kg jord/dag i oktober i et af de beluftede rum, som blev tilsat næringssalte.

3 Introduktion

3.1 Projektbeskrivelse

Forurening af jord og vand med dieselolie/fuelolie er et problem af stigende betydning. Årsager til forureningen kan f.eks. være spild/udslip fra tankstationer eller lækkende opbevaringstanke.

Størstedelen af olieforureningen er normalt kun nået til den umættede zone, når den opdages. Hvis forureningen af den umættede zone befinder sig langt under terræn eller tæt ved bygninger, rør, kabler eller andre permanente installationer, er udgravning af jorden meget vanskelig og meget kostbar. I sådanne tilfælde vil in-situ biologisk nedbrydning af dieselolien udført in-situ være et realistisk alternativ til udgravning. En yderligere fordel ved at benytte in-situ biologisk nedbrydning er den minimale fysiske forstyrrelse på den forurenede grund og den deraf følgende minimale forstyrrelse af aktiviteter på grunden. I en situation, hvor en stor mængde jord er forurenede med en moderat oliekoncentration, vil konceptet med biologisk nedbrydning ligeledes være økonomisk favorabelt og et godt alternativ til udgravning.

Selvom in-situ biologisk jordrensning af olieforurenede jord benyttes regelmæssigt, eksisterer der kun få veldokumenterede eksempler, og på grund af utilstrækkelige kontrollforsøg er fortolkningen af de tilgængelige data ofte tvetydig. Specielt frembyder den uensartethed, der ofte er forbundet med forureningen, problemer, når resultaterne af jordrensningen skal dokumenteres.

3.2 Præsentation af de problemer, der undersøges i projektet

Formålet med projektet var at undersøge muligheden for at stimulere den biologiske nedbrydning af dieselolie i jord fra den umættede zone. Forsøgene blev udført under *simulerede* in-situ betingelser, dvs. at den forurenede jord blev udgravet og anbragt i lukkede containere, før behandlingen blev udført. Denne fremgangsmåde muliggjorde overvågning og kontrol af de forsøgsmæssige betingelser i højere grad, end hvis der var tale om en aktuel jordrensning udført in-situ. Metoden har yderligere den fordel, at der er mulighed for at blande jorden og derved i nogen grad homogenisere forureningen forud for jordrensningsforsøgene.

Den biologiske nedbrydning blev stimuleret via bioventing af jorden. Desuden blev det forsøgt at øge nedbrydningshastigheden ved at tilsætte næringsalte og bakterier, som var isoleret fra den forurenede jord.

Nedenstående spørgsmål ligger til grund for undersøgelserne:

- Hvilken hastighed kan opnås for biologisk nedbrydning af dieselolie ved bioventing af forurenede jord?
- Hvordan indvirker tilsætning af næringssalte og bakterier til jorden på hastigheden for biologisk nedbrydning?
- Hvilken sammenhæng er der mellem iltoptagelsen og kuldioxidproduktionen i forhold til hastigheden for biologisk nedbrydning?
- Beluftes jorden tilstrækkeligt med en svag luftstrøm gennem jordmatricen?
- Hvordan kan resultaterne fra dette projekt overføres til in-situ betingelser?

4 Baggrundsmateriale/Erfaringer fra tidligere undersøgelser

4.1 Tilsætning af adapterede mikroorganismer - starterkulturer

Inokulering af forurenede jord er ensbetydende med at udsætte mikroorganismer i et naturligt miljø med det formål at øge nedbrydningshastigheden eller omfanget af nedbrydningen af forureningen (eller begge dele).

Forudsætningen for, at inokuleringen skal lykkes, er, at de tilsatte organismer bevarer deres specialiserede metaboliske aktivitet (evnen til at nedbryde de fleste oliekomponenter, genetisk stabilitet, evnen til at bevare vækst og nedbrydningskapacitet efter opbevaring). Derudover kræves det, at organismene bliver transporteret, så de kommer i kontakt med forureningen og næringssalte, og at omgivelserne understøtter nedbrydningsaktiviteten og mikroorganismernes overlevelse (hurtig vækst efter opbevaringen, høj enzymatisk aktivitet og vækst i jordmiljøet, evnen til at kunne konkurrere med den naturlige jordflora). Ved tilsætning af kulturer skal det på forhånd undersøges, at kulturerne ikke er patogene eller i stand til at producere toksiske metabolitter (Atlas, 1977 & 1991).

Ved spredning i et heterogent miljø som jord udsættes mikroorganismer for en lang række abiotiske og biologiske stressfaktorer. De vigtigste abiotiske faktorer er pH, vandindhold, temperatur, redoxforhold og i særdeleshed indholdet af næringsstoffer. Under de fremherskende oligotrofe forhold i de fleste jorde er mikroorganismene oftest udsat for sult stress, hvilket favoriserer indigene organismer tilpasset dette miljø, idet tilsatte mikroorganismer oftest er opformeret under næringsrige forhold.

De vigtigste biologiske faktorer, som påvirker overlevelsen af introducerede mikroorganismer, inkluderer alle former for mikrobiel interaktion såsom parasitisme, antagonisme, konkurrence og prædation. En lang række af disse faktorer påvirkes af jordens fysiske struktur, hovedsageligt pore størrelsen. Flere undersøgelser har vist, at en stor del af jordens bakterieflora findes i kapillære porer og dermed er beskyttet mod prædation fra protozoer og nematoder (Elliott et al., 1980). Samtidig forefindes næringsstoffer og forureningskomponenter netop adhæderede til partikeloverflader samt i kapillære hulrum. En tilsat bestand af mikroorganismer vil derimod hovedsageligt forefindes i mere åbne porositeter i jorden, indtil de beskyttende mikronicher er nået (Van Veen and Paul, 1981) og dermed i højere grad være udsat for abiotiske og biologiske stressfaktorer. Endelig kan det være vanskeligt at få inokuleret den forurenede jord tilstrækkeligt homogent, således at mikroorganismene kan komme i kontakt med forureningen.

Goldstein et al. (1985) angiver følgende grunde til at anvendelsen af starterkulturer ikke lykkes:

- koncentrationen af forureningskomponenten i naturen kan være for lav til at understøtte vækst af den tilsatte mikroorganisme
- den inokulerede jord kan indeholde stoffer, der inhiberer den tilsatte mikroorganismes vækst eller aktivitet
- den tilsatte mikroorganismes væksthastighed ved den lave koncentration af forureningskomponenter kan være mindre end prædationshastigheden (f.eks. af protozoer)
- den tilsatte mikroorganisme udnytter andre organiske stoffer i miljøet end forureningskomponenten, der ønskes fjernet
- den tilsatte mikroorganisme kan ikke trænge gennem porerne i jorden og frem til forureningen.

4.2 Opformering og spredning

Opformeringen vil typisk foregå i reaktorer ved submers dyrkning. Da forholdene ved opformeringen således er væsentlig anderledes end forholdene i jorden, er det af afgørende betydning, at den opformerede kulturs evne til at kolonisere jorden og nedbryde kulbrinter efterfølgende afprøves, inden den opformerede kultur spredes på den forurenede lokalitet.

Nogle undersøgelser har vist, at evnen til at nedbryde kulbrinter kan være plasmidbåren. Efter længere tid i et miljø, hvor kulbrinter ikke er til stede, og det selektive pres derfor ikke er til stede, kan det derfor forventes, at mikroorganismene vil miste evnen til kulbrintenedbrydning - plasmidet vil ikke overføres til de efterfølgende generationer (Leahy & Colwell, 1990).

Ved forsøg i laboratorieskala, hvor ganske små mængder inokulum er påkrævet, foretages opformeringen typisk på oliekomponenten. Ved forsøg i stor skala er denne fremgangsmåde ikke realistisk (tid og reaktorstørrelse). Til in-situ forsøg med spredning af mikroorganismene i jord er det desuden nødvendigt at frembringe en homogen, ikke viskøs væske som inokulum.

Ellis et al. (1990) har beskrevet storskalaforsøg med inokulering af olieforurenede jord med mikroorganismer. De opformerede mikroorganismer i 150 l reaktor på glucosebegrænset vækstmedium. Mikroorganismene blev dyrket ved 25-32°C i 48-80 timer med en slutkoncentration af bakterier på 10^{10} - 10^{11} CFU/ml. Kulturen blev centrifugeret, resuspenderet i fysiologisk saltvand og opbevaret ved 4°C i op til 5 dage inden inokulering.

Inokulering af jord med det formål at øge den biologiske rensning af jorden er en relativt ny teknologi, der har fået megen omtale. I de fleste beskrevne tilfælde er det ikke muligt at vurdere effekten af tilsætningen pga. manglende kontrolparceller, og pga. at rensningen ikke er kvantitativt overvåget gennem hele rensningsforløbet. Der mangler ligeledes viden om nedbrydningskinetik, dannelsen af eventuelle toksiske produkter, organismernes næringsbehov i jorden og faktorer, der påvirker mikroorganismernes transport og vedhæftning i jorden (Marlow et al., 1991).

Som tidligere nævnt kan det ved in-situ rensning være særdeles vanskeligt at få spredt starterkulturen (og eventuelle næringssalte) i jorden på den forurenede lokalitet. I lerede, kompakte jorde vil det næppe være muligt inden for en overskuelig periode at få spredt starterkulturen mere end få centimeter. I sandede jorde skulle det teoretisk være lettere, men f.eks. sprækkedannelser, luftlommer og mikroorganismers adhæsion til overfladen af jordpartikler kan medføre ikke-homogen og/eller mangelfuld spredning. Kraftig vækst af mikroorganismer i porerne kan medføre blokering af porerne i overfladelaget og dermed ringe videretransport. Ligeledes kan mikrobielt udviklet kuldioxid medvirke til dannelsen af luftlommer, hvorved væsketransporten mindskes.

Strategien - den anvendte metode ved spredningen - har selvsagt stor betydning for et vellykket resultat af in-situ rensning. Der vil dog ofte være en tæt sammenhæng mellem metodens effektivitet og omkostningerne til spredningen, f.eks. et meget stort antal borehuller. Detaljerede oplysninger om spredningssystemer er sparsomme i litteraturen, formentlig fordi de betragtes som virksomhedshemmeligheder.

Da det typisk er organismer, der allerede findes i jorden, der opformerer og udspreder, er det vanskeligt at verificere, at de tilsatte organismer spredes i den forurenede zone og dermed er årsag til en accelereret fjernelse af forureningen. Forsøg med fluorescensfarvede bakterier muliggør genfindelse af de udsatte bakterier (Harley et al, 1989), men kan dog give et for lavt estimat grundet manglende farvning af multiplicerede celler. Transportforsøg er desuden udført med indikatorbakterier, der ikke naturligt forekommer i større antal i jorden, f.eks. mælkesyrebakterier (Huysman & Verstrate, 1993b).

Med hensyn til inokuleringsmængde anbefaler Jang et al. (1983) i forbindelse med MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) en lav mængde (ca. 10^6 CFU/ml) for at undgå tilstopning i injektionszonen. Jang et al. angiver, at de inokulerede bakterier efter den initiale pumpning ved tilstedeværelsen af næringsstoffer vil spredes ved in-situ vækst og transport.

Ellis et al. (1990) har ved rensning af olieforurenede jord anvendt 150 liter væske indeholdende 10^{10} - 10^{11} CFU/ml til 1.600 m^3 jord med 185 ppm olie. Jorden blev inokuleret 4 gange i løbet af 15 uger og olieindholdet reduceret til 26 ppm. Dette svarer til en inokuleringsmængde på ca. 10^6 CFU/ml. Ved en anden oprensning udført in-situ (Ellis et al, 1991) på en

creosotforurenede grund (PAH'er) blev anvendt inokulering med 10^6 resuspenderede frysetørrede celler/g jord ved starten af hver ny sommersæson.

Kulturtætheder på 10^{11} /ml kan være vanskelige at opnå, men da opfremmede kulturer typisk nedcentrifugeres og opslæmmes i buffer før inokulering af den forurenede jord, er der rig mulighed for at manipulere med koncentrationen af bakterier. Inokulering med mikroorganismene i substratet anvendt til opformeringen vil medføre tilførsel af en lang række næringsstoffer til jorden, efterfulgt af et øget iltforbrug til omsætning heraf. Som sideeffekt ville det volde problemer, da kontroljorden i så fald skulle inokuleres med et tilsvarende medie.

Inokuleres med lave mængder af nedbrydningsorganismer, risikerer man, at kulturen ikke opformerer sig til et niveau, hvor en tilstrækkelig nedbrydning af forureningen finder sted - evt. fordi den naturlige bestand konkurrerer om de begrænsede uorganiske næringsstoffer.

4.3 Mikrobiel transport og vedhæftning i jord

De forhold, der gør mikroorganismer i stand til at overleve i og kolonisere jordmiljøet, er mange og dog ringe belyst. Den meget store heterogenitet og kompleksitet af jordens fysiske og biologiske egenskaber medfører, at de er vanskelige at undersøge. Fluktuationer, både i makro- og mikro-skala, af faktorer som indhold af organiske stoffer, vand og ilt kan føre til store forskelle i den mikrobielle sammensætning.

Når mikroorganismene er til stede i overfladejorden, er der især to faktorer, der kontrollerer deres skæbne: overlevelse og transport. Både overlevelse og transport er igen betinget af den specifikke mikroorganisme, jorden og miljøfaktorerne. Af miljøfaktorerne har især temperatur og nedbørmængde betydning. Under bakteriernes bevægelse gennem jorden ned til forureningen kan de miste deres vitalitet pga. sult, prædation, lysning eller parasitisme. Transporten kan desuden i tillæg hertil hæmmes af filtrering og adsorption (en binding etableres mellem bakterien og faste partiklers overflader). Bakterie-adhæring påvirkes af en række faktorer såsom bakterieoverfladens netto-elektrostatisk ladning, tilstedeværelsen af ekstracellulære polysaccharider og cellens hydrofobicitet (Gannon et al., 1991).

Mikroorganismernes egenskaber, der påvirker transporten i jorden, er størrelse, form, antal, bevægelighed samt cellevæggens tilstand (hydrofil eller hydrofob, overflade netto-elektrostatisk ladning), og hårdhed samt mikroorganismernes tendens til aggregatdannelse (Jennemann et al., 1985; Fontes et al. 1991; MacLoad et al., 1988; Gannon et al. 1991a; Gannon et al. 1991b; Huysman & Verstraete, 1993a; Huysman & Verstraete, 1993b).

Bakteriers størrelse har betydning for, hvor hurtigt de transporteres. Størrelsen er afgørende for, om de er i stand til at passere porerne i jorden. De store celler kan ikke trænge ind i de små porer, hvorved transportvejen bliver kortere (jævnfør gel-chromatografi-teorien). Hvor

adsorption ikke finder sted, vil større celler bevæge sig hurtigere gennem jorden end små (Yates & Yates, 1988).

Litteraturangivelserne om de forskellige faktorerers indbyrdes betydning er ofte modstridende, øjensynlig pga. de stærkt varierende forsøgs omstændigheder - jordtyper, mikroorganismer m.m.

Den mest afgørende faktor for mikrobiel transport i jord er jordpartiklernes filtrering af mikroorganismene (Yates & Yates, 1988). Dette betyder, at jorde med stor pore-størrelse som f.eks. sand og grus tillader hurtig transport af mikroorganismer, hvorimod transporten i finkornet jord er langsom.

Mikroorganismer og de fleste partikler (ler- og humuspartikler) er negativt ladede på overfladen. Af forskellige jordtyper betragtes lerholdige jorde som dem, der i højeste grad påvirker den mikrobielle aktivitet. Dette skyldes jordtypens store overfladeareal og ionbytningssevne, hvilket resulterer i en stor absorptionskapacitet. Overfladen vil være negativt ladet ved lave og positivt ladet ved høje pH-værdier (Yates & Yates, 1988). Sammenlignet hermed er sand og silt relativt inert (Hamer & Heitzer, 1991). Den meget langsomme transport i lerede finkornede jorde skyldes altså både jordpartiklernes filtrering af mikroorganismene, og at mikroorganismene adhæderer til jordpartiklerne.

In-situ biologisk jordrensning kan kun forventes at lykkes i sandede jorde med porøsiteter større end 10^{-4} cm/s (Hoeppel et al. 1991) og 5×10^{-4} cm/s (Lund, 1990).

Jordens adsorptionskapacitet kan påvirkes ved at ændre pH eller ionstyrken (kationindholdet) (Yates & Yates, 1988).

Tilstedeværelsen af visse salte har betydning for mikroorganismers tilbageholdelse i jord. Nogle kationer, f.eks. Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , NH_4^+ og Na^+ kan fremme bakteriers adsorption til jord (i koncentrationer, der er almindelige i jord) ved at neutralisere bakteriernes negative overfladeladning (Smith et al., 1985; Gannon et al., 1991; Gordon & Millero, 1984; Fontes et al., 1991). I forbindelse med in-situ rensning af jord er det vigtigt at være opmærksom på disse forhold, da jord typisk inokuleres med starterkultur efter tilsætning af næringssaltopløsning (indeholdende f.eks. NH_4^+).

Et af de væsentligste parametre for mikrobiel transport er jordens vandindhold. Sammenlignende studier af litteraturen omhandler bakteriers transport har ført til den konklusion, at bakterier kan bevæge sig over langt større afstande i mættede jordzoner end i umættede jordzoner (Yates & Yates, 1988). Ved lavt vandindhold i jorden (i den umættede zone) bliver bakteriernes transport reduceret, fordi transportvejen bliver begrænset til vandfilmen på jordpartiklerne og i de mindre porer (Trevors et al., 1990; Elsas et al., 1991). Ved vandindhold under markkapacitet er

den mikrobielle transport ubetydelig. Ved højere jordvandspotentialer bliver størstedelen af bakterierne transporteret gennem makroporerne.

Mængden af væske, der tilsættes jordoverfladen, samt hastigheden, hvorved væsken tilsættes, påvirker den mikrobielle transport. Høje belastingshastigheder vil få væsken til at bevæge sig hurtigt gennem jorden og mindsker derved kontakttiden mellem mikroorganisme og jord og dermed sandsynligheden for adsorption (Marlow et al., 1991; Huysman & Verstrate, 1993).

Gennemtrængningshastigheder for bakterier i jord op til 0,5 m/time er iagttaget i pakkede sandsøjler (Fontes et al., 1991). Transporthastighederne i umættede jorde må som nævnt forventes at være meget langsomme. In-situ forsøg med inokulering af umættet jordzone uden i det mindste periodevis påsætning af gradient (vand + tryk/vakuum) må derfor anses for særdeles uhensigtsmæssige.

Ved undersøgelser af mikroorganismers transporthastigheder i jord er det vigtigt at skelne mellem forsøg udført i intakt jord og forsøg udført på pakkede jordsøjler. Transporten i pakkede jordsøjler er meget langsommere (op til 100 gange) end i intakt jord - øjensynlig fordi kolonnerne er pakket således, at makroporer og sprækker, der er de naturlige transportveje, er elimineret (McDowell et al., 1986; Harvey et al., 1989; Smith et al., 1985; Elsas et al., 1991). Effekten vil være størst i lerrige jorde og jorde rig på organisk stof, da mikroorganismene især vil adhædere hertil (Smith et al., 1985).

Det kan konkluderes om mikrobiel transport gennem jord i forbindelse med in-situ jordrensning, at langt hovedparten af studierne er foretaget i mættet jordzone som model eksperimenter i jordsøjler. Laboratorieforsøg har vist, at bakterier under visse betingelser er endog meget mobile. Bakterier kan nedbryde særlige forurenende stoffer, overleve og være aktive i jordsøjler.

Hurtig transport vil kunne ske i porøs sandjord og i inhomogen jord med revner og mange makroporer. Afhængig af specifikke forhold på den enkelte lokalitet som lerindhold, porestørrelse, hydraulisk ledningsevne m.m. kan de nævnte faktorer have større eller mindre betydning. I mættet zone og porøse jorde ses migrationshastigheder i størrelsesordenen cm/døgn - 1 m/døgn, med pålagt gradient op til flere m/døgn. I umættede jorde må migrationshastigheden forventes at være meget lavere.

4.4 Systemer til bioventing og spredning af næringsalte og bakterier

Antallet af projekter, der har undersøgt anvendelse af bioventing ved biologisk jordrensning af lokaliteter forurenede med dieselolie, er steget i de seneste år.

Dupont & Doucette (1992) fandt i arbejdet med vakuumentilering af jorden, at hvis man reducerede ventileringen fra en luftudskiftning på 6,5 porevolumener/dag til 1,5-3 porevolumener/dag, betød det, at den biologiske nedbrydning tegnede sig for mindst 80% af reduktionen af kulbrinter. Bioventing blev udført med 15 lodrette og 10 vandrette boringer (21 injektionsboringer og 4 ekstraktionsboringer). Benzinforureningen forekom i den umættede zone i et område på 4.000 m² og med en dybde på ned til 15 m. Til at begynde med var koncentrationen af kulbrinter 1.000-5.000 mg/kg, og efter 25 måneder var gennemsnitskoncentrationen af totalkulbrinter i jorden 4 mg/kg med et maksimum på 38 mg/kg. Der blev i perioden tilsat en tør blanding af næringssalte (ammoniumnitrat + natriumtrifosfat) til jordoverfladen, som var udstyret med sprinkling.

Eyk & Vreeken (1989) opnåede et fald i dieseloliekoncentrationen fra 10.364 mg/kg til 6.965 mg/kg med en gennemsnitlig nedbrydningshastighed på 8 mg/kg/dag efter gennem 12 måneder at have gennemført bioventing på en grund forurenet med dieselolie.

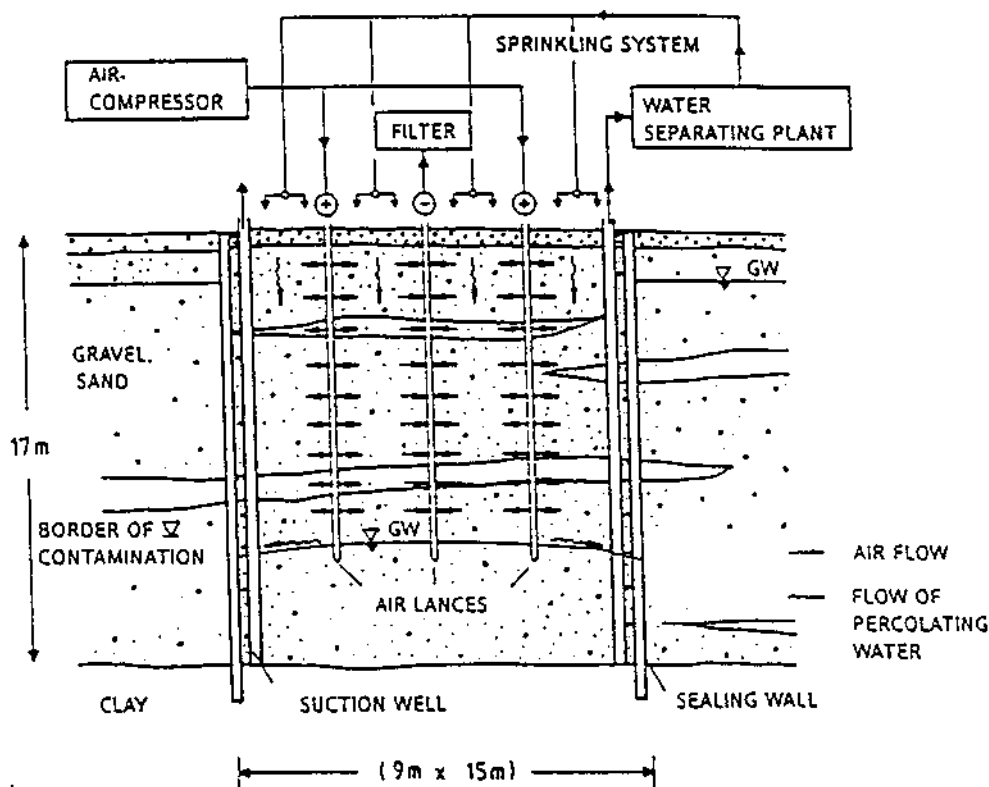
På en lokalitet (200 m²) forurenet med fyringsolie gennemførtes bioventing, og udvalgte bakterier samt opløste næringssalte blev tilsat (Gruiz, 1993; Gruiz, 1992). Forsøget viste, at luftudsugning vha. ventilatorer var mere effektivt end injektion af luft ved hjælp af kompressorer. I løbet af 3 måneder faldt olieindholdet fra de oprindelige 1.000-20.000 mg/kg til 170-380 mg/kg.

Kampbell et al. (1992) og Griffin & Armstrong (1992) udførte bioventing på et område (10.000 m³) forurenet med flybrændstof. 30 lodrette injektionsboringer og 7 ekstraktionsboringer gav en luftudskiftning på 1 porevolumen/dag. I løbet af en periode på 9 måneder faldt den samlede koncentration af kulbrinter fra 2.060 mg/kg til 38 mg/kg.

På en flybase i Utah, U.S.A., er der gennemført et forsøg til undersøgelse af bioventings virkning på jord forurenet med JP-4 flybrændstof. De endelige resultater er endnu ikke offentliggjort, men en respirationstest udført in-situ viste, at flybrændstoffet blev nedbrudt med en hastighed på $2,9 \pm 0,2$ mg hexan/kg jord/dag (Ong et al., 1991; Sayles et al., 1992). En respirationstest udført in-situ består af måling af iltoptagelsen og kuldioxidproduktionen, hvorefter disse sammenholdes med den biologiske nedbrydning af kulbrinter.

Figur 4.4.1 viser bioventingsystemet, som blev benyttet af Gudehus et al. (1993) og Gudehus (1990). En vandret luftstrøm blev frembragt vha. luftkanaler, som enten tilførte eller udsugede luft. Samtidig blev vand indeholdende næringssalte tilført gennem sprinkleranlægget og perkoleret gennem jordmatrixen. Vandmængden i jordmatrixen skal til enhver tid være lille nok til at give plads for en tilstrækkelig luftstrøm. Gudehus et al. (1993) har undersøgt biologisk nedbrydning af kulbrinter i jord med forurening fra gasværker. Der var problemer med at vurdere jordrensningprocessen pga. den uregelmæssige fordeling af forureningskompo-

nenter. I en periode på 300 dage varierede nedbrydningshastigheden mellem 25 og 2 mg kulbrinter/kg jord/dag (ved en temperatur på 15°C).



Figur 4.4.1

Illustration af grundprincipperne for overflade- og underjordiske installationer på forsøgsområdet (lodret tværsnit). Fra Gudehus et al. (1993).

Der findes kun få resultater fra bioventing udført in-situ i Danmark. Nielsen (1993) har beskrevet 12 steder, hvor bioventing har været benyttet eller vil blive benyttet til nedbrydning af kulbrinter. Der er dog såvidt vides ikke offentliggjort resultater, der viser, i hvilken udstrækning faldet i kulbrintekonzentrationen er forårsaget af biologisk nedbrydning.

Generelt er systemerne, som benyttes til spredning af bakterier og næringssalte, kun sparsomt beskrevet. Det er dog mest almindeligt, at bakterier og næringssalte opløses i vand, som så perkolerer gennem jordmatricen. Til spredning af vandet benyttes sprinkleranlæg eller drænrør.

Bioventing foretages vha. vandrette eller lodrette injektionsboringer. Boringerne består af perforerede stålrør omgivet af grus. Der er flest omkostninger forbundet med etablering af vandrette injektionsboringer. Under bygninger og installationer kan det dog være nødvendigt at etablere vandrette injektionsboringer; men hvis lodrette boringer kan benyttes, bør denne løsning foretrækkes.

5 For-forsøg

5.1 Valg af iltkilde

Flere undersøgelser har vist, at de forskellige komponenter i dieselolie kan nedbrydes under aerobe forbindelser. I dette projekt blev 3 alternative metoder til iltning af jordmatricen overvejet:

- 1) Bioventing med atmosfærisk luft
- 2) Bioventing med ilt
- 3) Perkolation af vand indeholdende H_2O_2 .

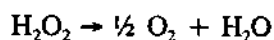
Atmosfærisk luft indeholder ca. 21 vol % ilt. Ved beluftningen af jordmatricen er der en risiko for, at flygtige kulbrinter fordamper. Lindhardt og Andersen (1991) har udført laboratorieeksperimenter omfattende beluftning af jord til undersøgelse af biologisk nedbrydning af dieselolie. Efter 50-120 dage blev der konstateret et fald på 50% i koncentrationen af dieselolie, og kun 1% af dette fald skyldtes fordampning af kulbrinter.

Bioventing af jordmatricen med ren ilt kræver et flow gennem jordmatricen, der er ca. 4-5 gange mindre end det tilsvarende flow af atmosfærisk luft. Da anvendelse af ren ilt dog medfører eksplønsionsrisici og ydermere øger omkostningerne betydeligt, var denne løsning ikke brugbar.

Antages det, at kulbrinteforureningen ligger i størrelsesordenen 5.000 mg/kg jord, kan behovet for ilt beregnes til 17,4 g ilt/kg jord (se appendiks 1) (Huling & Bledsoe, 1991). Denne værdi svarer til et behov på 3,5 g ilt/g olie, som svarer til den af Dupont & Doucette (1992) benyttede mængde i forsøget med nedbrydning af flybrændstof. Lindhardt & Andersen (1991) har i deres beregninger kalkuleret med et iltbehov på 3 g ilt/g olie. Den nøjagtige værdi afhænger af olie-/brændstoffypen og forureningens alder, idet nedbrydningen vil medføre en ændring af forholdet mellem de forskellige grupper af komponenter. Endelig har Huling & Bledsoe (1991) fastslået, at det faktiske iltforbrug normalt er 25-50% højere end det støkiometrisk beregnede forbrug.

Beregningerne i appendiks 1 viser, at det med de angivne forudsætninger er muligt at udføre bioventing af jordmatricen med atmosfærisk luft.

I en del af ovennævnte forsøg har H_2O_2 været anvendt som iltningmiddel. Resultaterne af disse forsøg er imidlertid ikke altid overbevisende. Lee & Raymond (1991) og Frankenberger (1989) har fastslået, at H_2O_2 er et fornuftigt alternativ til ren ilt, idet det har en betydelig iltbufferkapacitet. Hydrogenperoxid spaltes i ilt og vand:



Huling & Bledsoe (1991) har beregnet den disponible mængde ilt ved brug af hydrogenperoxid vha. følgende ligning:

Disponibel O_2 = Iltkoncentration ved mætning + $0,47 \times H_2O_2$ koncentration.

Anvendelse af hydrogenperoxid kan derfor øge mængden af disponibel ilt betydeligt. Problemet med at anvende hydrogenperoxid er dog stoffets nedbrydningshastighed. Sker nedbrydningen for hurtigt, dannes der bobler af gas, som vil blokere jordens porer (Wheppen et al., 1992). I flere undersøgelser, hvor hydrogenperoxid er anvendt, rapporteres der om tilstopning i jordmatricen. Hvorvidt tilstopningen skyldtes luftbobler eller udfældning af fosfatsalte eller jernhydroxider fremgår ikke klart i alle tilfælde (Minugh et al., 1987). På baggrund af den gennemgåede litteratur står det klart, at der må foretages yderligere undersøgelser med udvalgt jordmateriale, før det kan afgøres, hvorvidt H_2O_2 er et brugbart alternativ.

I appendiks 2, 3 og 4 er stabilitetsforsøg med hydrogenperoxid beskrevet. Det er fastslået, at forskellige fosfater stabiliserer H_2O_2 i jorden, og effektiviteten er testet ved laboratorieforsøg.

Laboratorieforsøgene viste, at halveringstiden for H_2O_2 efter stabilisering i jorden er mellem 30 og 60 minutter. Lawes (1991) har fastslået, at halveringstid for H_2O_2 i jord fra forskellige jordmatricer varierer fra 15 til 360 minutter. H_2O_2 er bedst egnet som iltkilde i jord med høj halveringstid. På den baggrund har forsøgsresultaterne vist, at H_2O_2 ikke kunne stabiliseres tilstrækkeligt i jorden.

Hydrogenperoxid blev fundet mindre egnet som iltkilde, og der skulle bruges store mængder vand for at imødekomme behovet for ilt. Eftersom referencerne ligeledes påpegede, at der kunne være problemer med tilstopning af jordmatricen, blev det besluttet ikke at anvende hydrogenperoxid i disse forsøg.

5.2 Isolering af bakterier

5.2.1 Isolering af olienedbrydende bakterier vha. berigelseskulturer
Forskellige strategier er blevet anvendt i forbindelse med eksperimenter med inokulering af jord med olienedbrydende bakterier: Letomäki & Niemelä (1975) og Ellis et al. (1990) isolerede renkulturer bestående af olienedbrydende bakterier, hvorimod Portier et al. (1988) benyttede et kommercielt tilgængeligt inokulum.

Rapporter, der beskriver en positiv effekt af inokulering af olieforurenet jord med olienedbrydende bakterier, er få, og der kan ikke drages nogen entydig konklusion af disse mht. den optimale sammensætning af inokulum. Muligvis ville en berigelseskultur af ukendt sammensætning udgøre det mest effektive olienedbrydende inokulum, men i den foreliggende rapport er der valgt at arbejde med renkulturer, hovedsagelig af følgende grund: Resultatet af en fermentering i stor skala af en bakteriel blandings-

kultur ville være helt uforudsigeligt mht. sammensætning og nedbrydningspotentiale. For at opveje dette ville det være nødvendigt med gentagne fermenteringer i stor skala for at teste inokulum for evne til at nedbryde olie - en mulighed der ikke kom på tale af tidsmæssige og økonomiske årsager.

De følgende betingelser blev valgt for berigelseskulturernes: seks forskellige kulbrinter og én kompleks kulbrinteblending blev benyttet som substrater: Octan, hexadecan, eicosan, naphthalen, phenanthren, pyren og dieselolie.

Batches, hver indeholdende ét af ovennævnte substrater i en koncentration på 0,1% (v/vol.) i Muller-Hurtig minimalmedium (Oberbremer & Muller-Hurtig, 1989), blev inokuleret med 1 ml slurry bestående af dieselolieforurenede jord i Winogradsky minimalmedium. Efter tre subkulturer blev der fremstillet stregkulturer på plate count agar, og kolonier isoleret herfra blev dyrket i endnu to subkulturer i Muller-Hurtig medium. Til sidst blev der igen fremstillet stregkulturer på Plate Count Agar, og isolater herfra blev testet for deres dieselolienedbrydende evner i batch-kulturer med dieselolie som substrat. Batchene blev ekstraheret med pentan, og dieselolienedbrydning blev verificeret med gaschromatografi.

Resultatet af de indledende berigelser blev to renkulturer, som var i stand til at nedbryde dieselolie; én beriget på dieselolie og den anden (HEX1) på hexadecan. Renkulturer isoleret på octan, eicosan og phenanthren kunne ikke nedbryde dieselolie i batch-kulturer. Der blev ikke isoleret nogen renkultur på pyren. Det blev derfor besluttet udelukkende at benytte dieselolie og hexadecan som substrater i de videre berigelsesforsøg.

Totalt isoleredes 29 bakteriekulturer vha. berigelseskulturer med hhv. dieselolie og hexadecan som substrater.

5.2.2 Batch-forsøg: Tilsætning af en olienedbrydende renkultur til dieselolieforurenede jord

For at kunne fastsætte parametre såsom den optimale inokulumstørrelse og behovet for at tilsætte fosfat og nitrat til forsøgsjorden blev der udført forskellige batch-forsøg i jordmikrokosmos. Jord fra containerforsøget blev benyttet, dog uden tilsætning af uforurenede sand.

Mineraliseringen af dieselolie blev bestemt med gaschromatografiske analyser af dieselolieindholdet i jorden og vha. måling af ophobning af kuldioxid i mikrokosmos. Deraf blev den kumulerede kulstofmineralisering beregnet. Den kumulerede kulstofmineralisering er tidligere blevet benyttet til at estimere mineralisering af olie i jord (Rasiah et al., 1992).

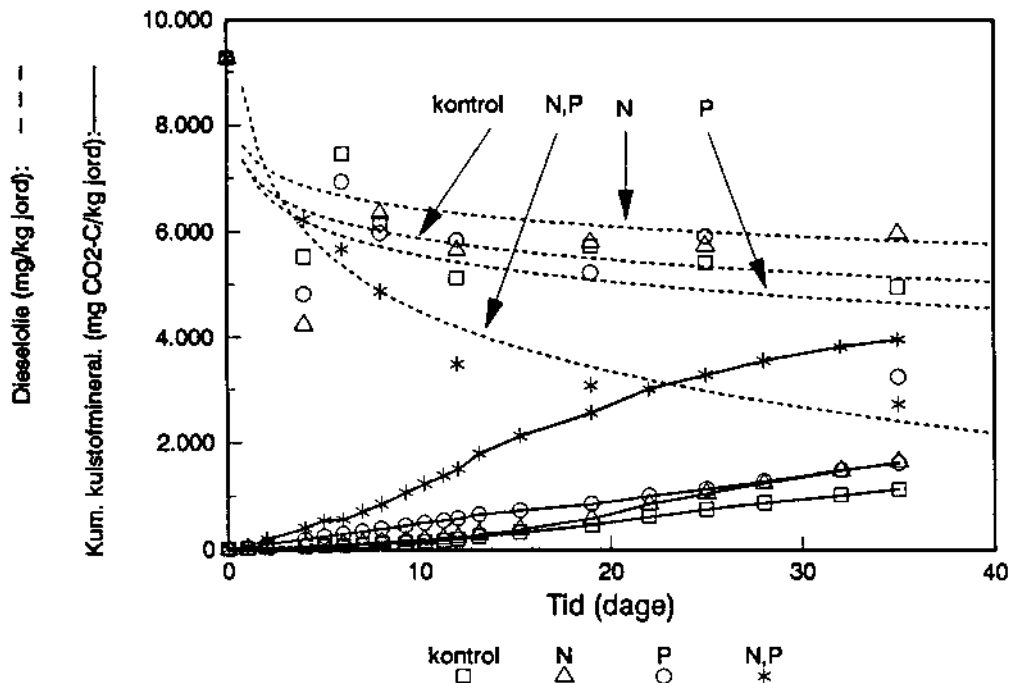
Jordmikrokosmos bestod af 100 g (tørvægt) homogeniseret jord (passeret gennem en 4 mm sigte) i 0,5 l infusionsflasker forsynet med gummiprop- per. Nitrat og fosfat blev tilsat i form af NH_4NO_3 og K_2HPO_4 i vandig op-

løsning (Song et al., 1990), således at C:N:P-forholdet blev 120:10:1 (Sims et al., 1990). Vandindholdet i jorden blev indstillet til 12% svarende til 60% af markkapaciteten.

Inokulum bestod af celler fra den dieselolienedbrydende renkultur HEX1 dyrket i 2 l fermentorer på Teknologisk Institut og vasket i Muller-Hurtig mineral medium. Størrelsen af inokulum blev bestemt ved udpladning på Plate Count Agar. Cellerne beholdt deres dieselolienedbrydende egenskaber under fermenteringen, hvilket blev eftervist ved batch-dyrkninger i sterilt Muller-Hurtig mineral medie tilsat dieselolie som substrat.

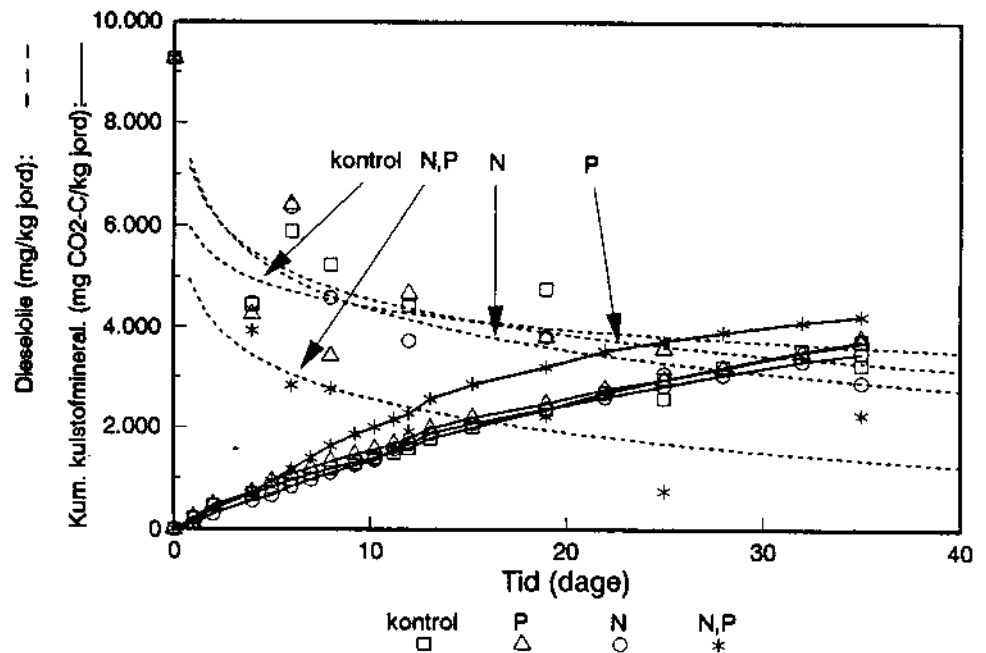
Olieindholdet i jordmikrokosmos blev bestemt i en 10 g (tørvægt) delprøve fra hvert mikrokosmos. Delprøven blev ekstraheret med pentan, og dieselolie blev kvantificeret vha. gaschromatografi (en detaljeret beskrivelse af metoden ses i appendiks 12).

Den kumulerede kulstofmineralisering blev bestemt gaschromatografisk ved at måle på luftprøver fra mikrokosmos' headspace. For at sikre optimale iltforhold blev mikrokosmos gennemluftet efter hver måling.



Figur 5.2.1
Nedbrydning af dieselolie og den kumulerede kulstofmineralisering i jordmikrokosmos tilsat forskellige mængder af nitrat og fosfat.

Figur 5.2.1 viser nedbrydning af dieselolie og den kumulerede kulstof-mineralisering gennem 35 døgn i uinokulerede batches tilsat forskellige mængder af nitrat og fosfat. Tilsætning af N og P hver for sig resulterede ikke i væsentlig forhøjelse af den kumulerede kulstofmineralisering eller af dieselolienedbrydningen, men samtidig tilsætning af N og P fordoblede den kumulerede kulstofmineralisering og fremmede nedbrydningen tilsvarende. Dette betød, at dieselolienedbrydningen var begrænset af mængden af tilgængeligt nitrat og fosfat i jorden.



Figur 5.2.2

Nedbrydning af dieselolie og den kumulerede kulstofmineralisering i jordmikrokosmos inokuleret med $3,9 \times 10^8$ HEX1-celler/g jord og tilsat forskellige mængder af nitrat og fosfat.

Figur 5.2.2 viser nedbrydning af dieselolie og den kumulerede kulstof-mineralisering i inokulerede batches tilsat forskellige mængder af nitrat og fosfat. Samtidig tilsætning af HEX1-celler, nitrat og fosfat resulterede i en øget kumuleret kulstofmineralisering og en stigning i dieselolienedbrydningen i forhold til en kontrol.

Den høje kumulerede carbonmineralisering i de inokulerede mikrokosmos, hvor der ikke samtidig blev tilsat nitrat og fosfat, er ikke i overensstemmelse med resultaterne vist på figur 5.2.1. Dette kunne forklares med, at inokulum - i forsøgene beskrevet på figur 5.2.2 - fungerede som substrat og næringsstofkilde for den indigene mikrobielle population.

Yderligere forsøg (ikke vist) med mindre end $3,9 \times 10^8$ HEX1-celler/g jord som inokulum havde ingen positiv effekt på nedbrydning af dieselolie og kumuleret kulstofmineralisering.

Af ovenstående forsøg kan det konkluderes, at inokulering med samtidig tilsætning af nitrat og fosfat havde en positiv effekt på nedbrydningen af dieselolie og den kumulerede kulstofmineralisering i forhold til udelukkende inokulering, men at effekten i forhold til uinokulerede batches tilsat næringsstoffer var marginal.

5.2.3 Udvalgelse af en olienedbrydende renkultur til brug i containerforsøget

Yderligere batch-eksperimenter (ikke vist) blev udført med 7 forskellige olienedbrydende renkulturer - enkeltvis og i blanding - og én phenanthrenedbrydende renkultur. Ingen af disse kulturer, hverken enkeltvis eller i blanding, var bedre til at nedbryde dieselolie i jordmikrokosmos end renkulturen HEX1.

Det blev derfor besluttet at basere de videre forsøg med udvælgelse af kulturer til brug i containerforsøget på kulturernes evne til dieselolienedbrydning i Muller-Hurtig mineral medium og på væksthastigheder i fermentor.

Ud fra disse kriterier blev bakterierenkulturen DO7-II-1, en gram positiv, oxidase- og catalase positiv stav, som var i stand til at nedbryde 85% af den tilsatte mængde dieselolie i Muller-Hurtig mineralmedium, valgt til inokulum i containerforsøget.

5.2.4 Metoder til at detektere olienedbrydende bakterier i jord

Fire forskellige teknikker er rutinemæssigt blevet benyttet til at tælle og isolere olienedbrydende bakterier:

- vækst på olie-agarplader
- vækst på agarplader med kulbrinter på dampform som substrater
- dyrkning i MPN-rør
- udnyttelse af olienedbrydende bakteriers evne til at opløse - og danne plaques i - kulbrinter på fast form sprayet på agarplader.

Olie-agarplader er ikke særlig velegnede til at detektere olienedbrydende bakterier med pga. det vanskelige i at blande olie i et vandigt medium samt forekomsten af vækst på urenheder i agaren (Walker & Colwell, 1975). Alligevel ses teknikken stadig anvendt (Venkateswaran et al., 1991).

Bakterievækst på kulbrinter på dampform er blevet anvendt til at påvise olienedbrydende bakterier (Rusansky et al., 1987), skønt det er vanskeligt at konstruere relevante kontroller, idet bakterierne vokser på urenheder i agaren. Bortset herfra ville metoden ikke i nærværende projekt være velegnet til at detektere dieselolienedbrydende bakterier pga. den forholdsvis lille andel af flygtige komponenter i dieselolie.

MPN-rør med en kompleks kulbrinteblending som substrat er blevet anvendt til at estimere potentialet for nedbrydning af kulbrinter (Song & Bartha, 1990; Lindstrom et al., 1991). Da MPN-teknikken er meget arbejdskrævende, er der blevet udviklet en miniature MPN-metode (Brown & Braddock, 1990). Denne metode anvender mikrotitre plader med 24 brønde, som hver tilsættes et minimalmedie og 5 μ l råolie. Kriteriet for at score en positiv brønd er dispergering af det mørke olielag. Metoden ville være uhensigtsmæssig i containerforsøget med dieselolie som substrat pga. vanskeligheder med at se dispergering af et tyndt lag dieselolie.

Kiyohara et al. (1982) udviklede en metode til at detektere bakterier, som er i stand til at nedbryde kulbrinter på fast form. Der anvendes agarplader sprayet med den pågældende kulbrinte opløst i æter: æteren fordamper og efterlader et tyndt lysbrydende lag af kulbrinte på overfladen af pladerne. Bakterier, som er i stand til at vokse på kulbrinten, danner plaques i kulbrintelaget, og de kan derved tælles.

Denne spray-metode viste sig at være mindre arbejdskrævende end miniature MPN-metoden og blev derfor valgt til at tælle olienedbrydende bakterier i nærværende projekt. Metoden er hidtil hovedsagelig anvendt til isolering af PAH-nedbrydende bakterier (Heitkamp et al., 1988) og ikke nedbrydere af ligekædede alkaner.

Lindstrom et al. (1991) og andre associerede nedbrydning af hexadecan med den mere generelle evne til at nedbryde komplekse kulbrinteblandinger. De estimerede den olienedbrydende kapacitet hos de indigene bakterier i forbindelse med olieforureninger ved at tælle de bakterier, der var i stand til at nedbryde radioaktivt mærket hexadecan.

Det blev derfor besluttet at estimere antallet af dieselolienedbrydende bakterier i containerforsøget ved at bestemme potentialet for hexadecan-nedbrydning. Dette blev gjort ved at spraye præ-inokulerede minimalagarplader med en opløsning af hexadecan i æter, hvorefter pladerne blev inkuberet ved 10°C (pga. hexadecans lave smeltepunkt).

For at vise spray-metodens brugbarhed i denne sammenhæng, blev 29 dieselolienedbrydende isolater testet på minimalagarplader sprayet med hexadecan og inkuberet ved 10°C. Alle isolaterne var i stand til at danne plaques i hexadecanlaget, hvilket understreger metodens velegnethed.

5.3 Opformering af bakterier

Baseret på indledende batchforsøg med forskellige substrater til opformering af bakterier blev et mineralmedium (Obenheimer & Huller-Hurtig, 1989), 20,0 g/l pepton, 10,0 g/l gærekstrakt og 20 g/l glukose valgt.

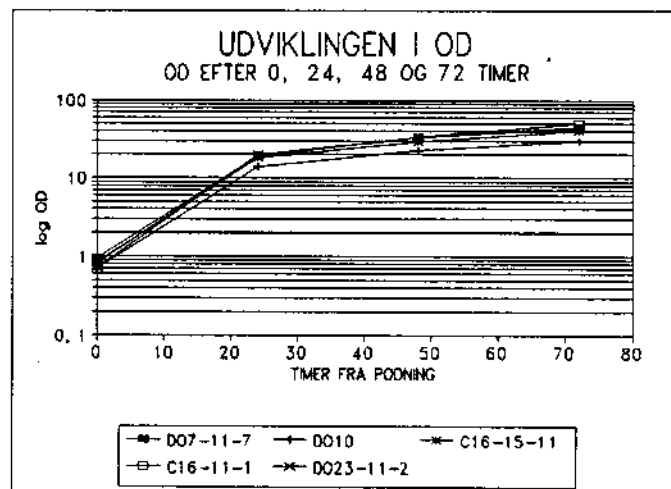
Kulturerne DO9-11-7, DO10, C₁₆-15-II, C₁₆-11-I, DO23-II-2, DO7-1, C₁₆-16-I, DO7-II-1, C₁₆-18-II og Hex1 blev opformeret i 2 liter fermentorer for at undersøge mulighederne for at opformere bakterierne og teste deres evne til at bevare dieselolienedbrydningssegenskaberne.

Kulturerne blev opformeret i et medium, der indeholdt pepton, gærekstrakt og glucose under sterile forhold ved 25°C, 400 rpm, 0,5 vvm luft og pH 6,9 - 7,1.

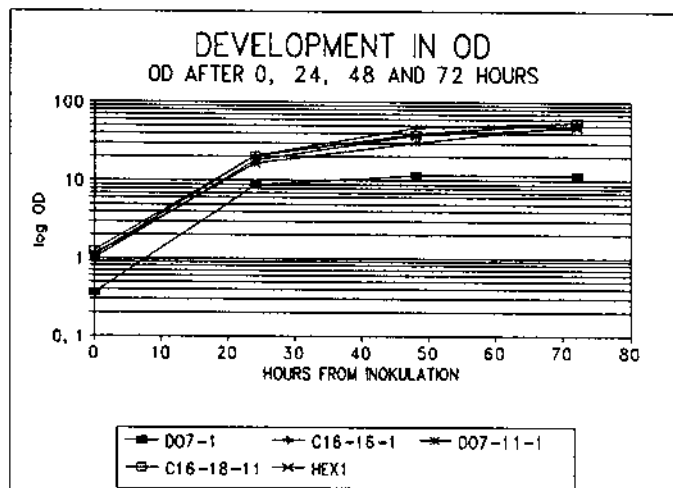
Som parametre for vækst blev anvendt:

- optisk densitet (OD) ved 620 nm
- celle tørstof (TS)
- kolonidannende enheder (CFU/ml) på Plate Count Agar

Resultaterne fra opformeringen i fermentorer er vist på figurene 5.3.1 og 5.3.2 samt tabel 5.3.1.



Figur 5.3.1
OD under opformering i fermentorer.



Figur 5.3.2
OD under opformering i fermentorer.

Tabel 5.3.1
Data fra 10 kulturer efter 72 timers fermentering.

Nr.	Kultur	OD	TS (g/l) (st. afv.)		CFU x 10 ¹⁰ (st. afv.)	
1	DO9-11-7	43	8,98	0,1	0,45	0,06
2	DO10	29,6	6,17	0,04	0,71	0,2
3	C16-15-II	39,8	7,94	0,06	0,47	0,01
4	C16-11-I	49,8	9,74	0,01	0,92	0,07
5	DO23-II-2	45	8,89	0,01	0,76	0,04
6	DO7-1	11,8	4,51	0,03	> 10 ⁶	
7	C16-16-I	55,3	7,78	0,55	1,17	0,03
8	DO7-II-1	51	10,45	0,05	0,71	0,09
9	C16-18-II	56,9	10,56	0,11	1,21	0,08
10	HEX1	47,8	6,04	0	1,69	0,08

Af data for de opformerede kulturer ses, at værdierne for hhv. OD, TS og CFU ikke følges helt ad. Dette kan forklares ved, at de fleste kulturer i større eller mindre grad klumper sammen (hvilket ses ved mikroskopi), og at bestemmelse af kimdannende enheder derfor ikke nødvendigvis er udtryk for antallet af individuelle bakterieceller. OD og tørstofmålingerne

viser i højere grad samme tendenser. Forskelle kan skyldes ændringer i substratkompositionen (farve, udfældninger) under fermenteringen.

Målet for opformeringen har været at opnå et højt kimindhold i kulturvæsken (i størrelsesordenen 10^{10} /ml). Bortset fra DO7-1 ville det være muligt at opformere kulturerne i overskuelige reaktorvoluminer.

Figureerne viser, at det ville være muligt at nå højere koncentrationer af nogle af kulturerne ved at anvende en længere fermenteringstid, især med kulturerne DO7-11-1, C₁₆-18-11 og C₁₆-11-1.

Kulturen blev opformet i en 50 l Biostat P, Braun fermentor under ovennævnte betingelser. Efter tre dages inkubation blev en $OD_{620} = 42$ og en CFU/ml DO7-II-1 = $8,3 \times 10^9$ nået. Kulturen blev kølet ned natten over og koncentreret og vasket ved brug af et Romicon hollow fiber membranmodul (membranareal 1,4 m²) med hydrofobe polysulfonmembraner, cut off værdi 50.000 kørt ved knap 2 bar under anvendelse af en Grundfos flertrins centrifugalpumpe og med et start permeatflux på 35 l/h (fluxen var ca. 10 l/h, efterhånden som viskositeten steg).

Koncentratet blev vasket med 40 liter 0,9% natriumkloridopløsning og kølet ned til 5°C før inokulering. Koncentrationen af bakterier i koncentratet var $2,2 \times 10^{10}$ CFU/ml og pH var 6,8.

6 Containerforsøg

6.1 Jordmateriale

Jorden, som er anvendt i projektet, stammer fra en dieselolieforurenede grund i Hedehusene. Den gennemsnitlige dieseloliekoncentration i jorden var ca. 4.000 mg kulbrinte/kg jord. Der blev ikke fundet tungmetaller i den forurenede jord. Jorden var sandet, og hydrogeologiske undersøgelser viste en rumvægt på 1,67 t/m³ og en permeabilitetskoefficient på $K \sim 1$ m/dag ved løs pakning af jorden, som svarer til fint sand i naturlig jord (Wilson, 1990).

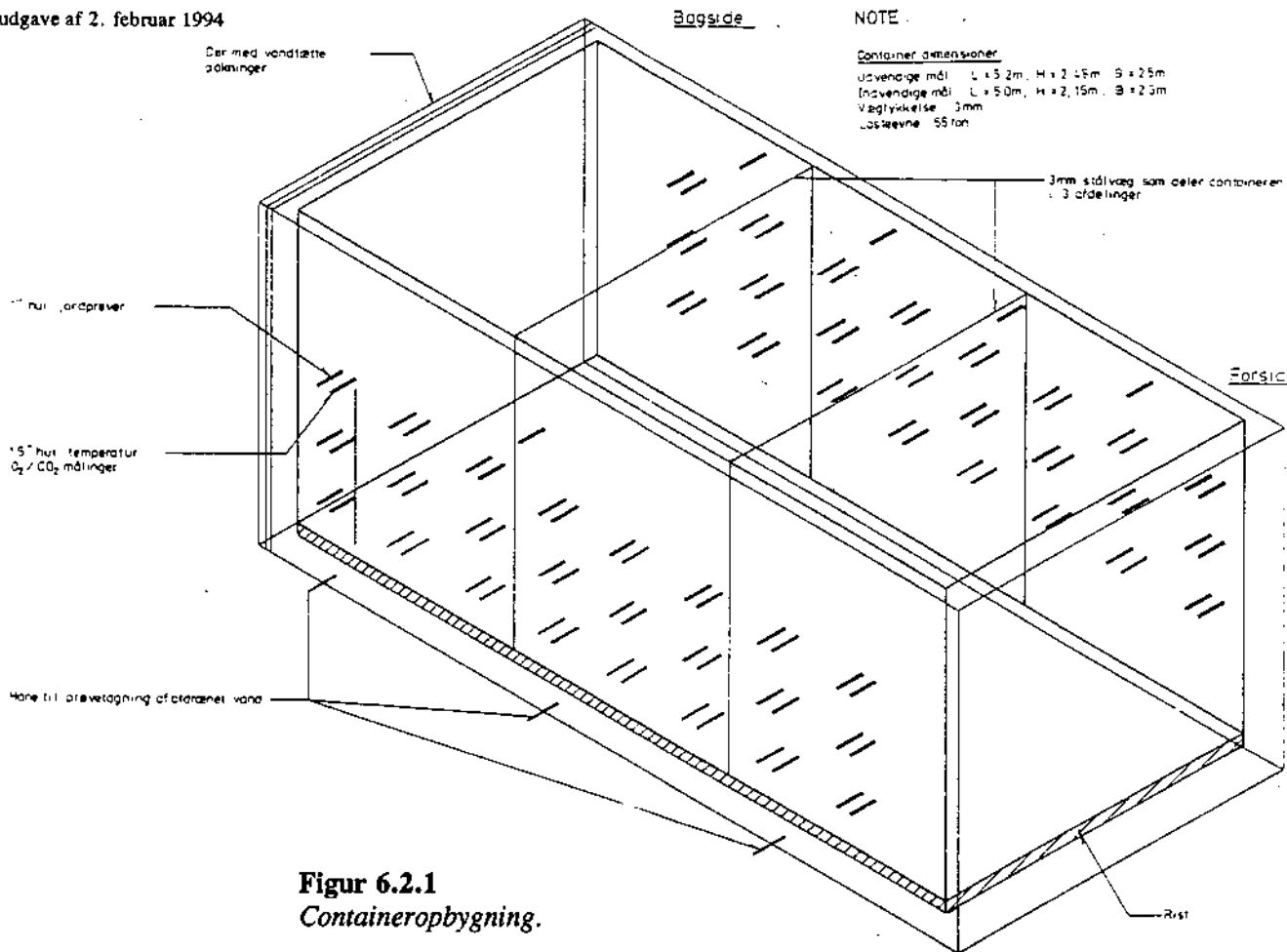
Ca. 20 m³ jord lokaliseret lige over grundvandsspejlet blev gravet op og transporteret til forsøgsområdet i Sørup ved København.

Som endeligt mål for jordrensningen blev fastsat en koncentration på 50 mg kulbrinter/kg jord. For at opnå denne koncentration inden for en begrænset periode blev den forurenede jord blandet med ovntørret kvartssand i forholdet 1:1, hvilket resulterede i en initial kulbrintekoncentration i jorden på 2.000 mg/kg jord. Kvantssandets og den forurenede jords partikelstørrelse var identisk (se appendiks 5). Blandingen af jord og kvartssand blev foretaget i en 8 m³ cementblander, og blandingen blev transporteret til containerne via et transportbånd. Tilsidst blev jorden komprimeret for at sikre, at vand- og luftpermeabiliteten svarer til in-situ forhold. Tilsætning af vand betød desuden, at jorden blev "pakket" yderligere, således at den kom så tæt på naturlige forhold som muligt.

6.2 Containeropbygning

To containere med et rumfang på hver 20 m³ blev anbragt i et telt på forsøgsområdet. Hver container var forsynet med studse til udtagning af jordprøver og måling af temperatur og ilt- og kuldioxidindhold. I bunden af containerne fandtes en rist og 3 huller til afdræning af vandet. Indersiden af containerne var malet med rustbeskyttende maling.

Begge containere var med stålplader opdelt i 3 rum. Herudover var der anbragt en geotekstildug i hvert rum for at holde jorden på plads. Containeropbygningen fremgår af figur 6.2.1.



Figur 6.2.1
Containeropbygning.

De 6 separate rum muliggjorde en sammenligning af følgende former for behandlinger af jorden:

Container 1

- Rum 1: Ingen behandling
- Rum 2: Beluftning og tilsætning af næringssalte
- Rum 3: Beluftning og tilsætning af næringssalte og bakterier

Container 2

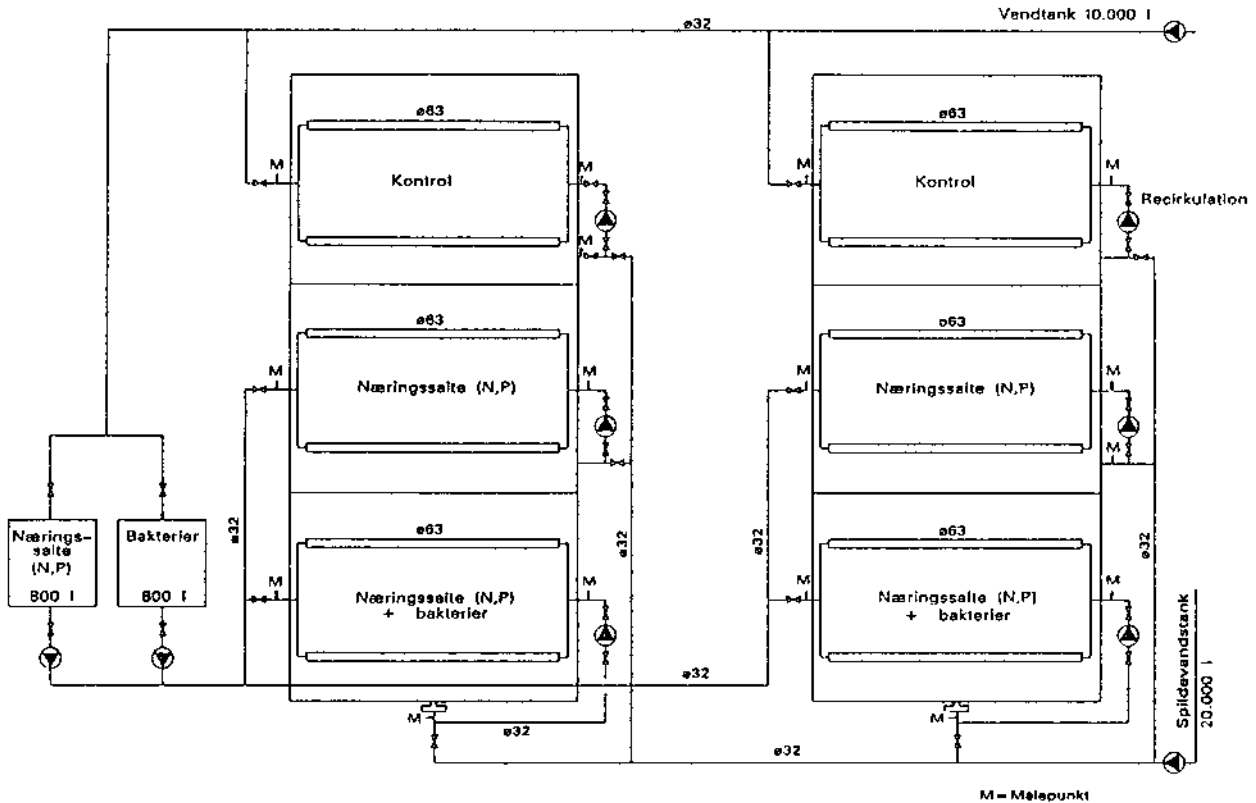
- Rum 1: Beluftning
- Rum 2: Beluftning og tilsætning af næringssalte
- Rum 3: Beluftning og tilsætning af næringssalte og bakterier

6.2.1 Opbygning af containeranlægget

På baggrund af den anvendte litteratur og praktiske overvejelser blev det besluttet at opbygge 2 separate systemer: Et vandssystem til spredning af næringssalte og bakterier og et bioventingsystem til spredning af luft.

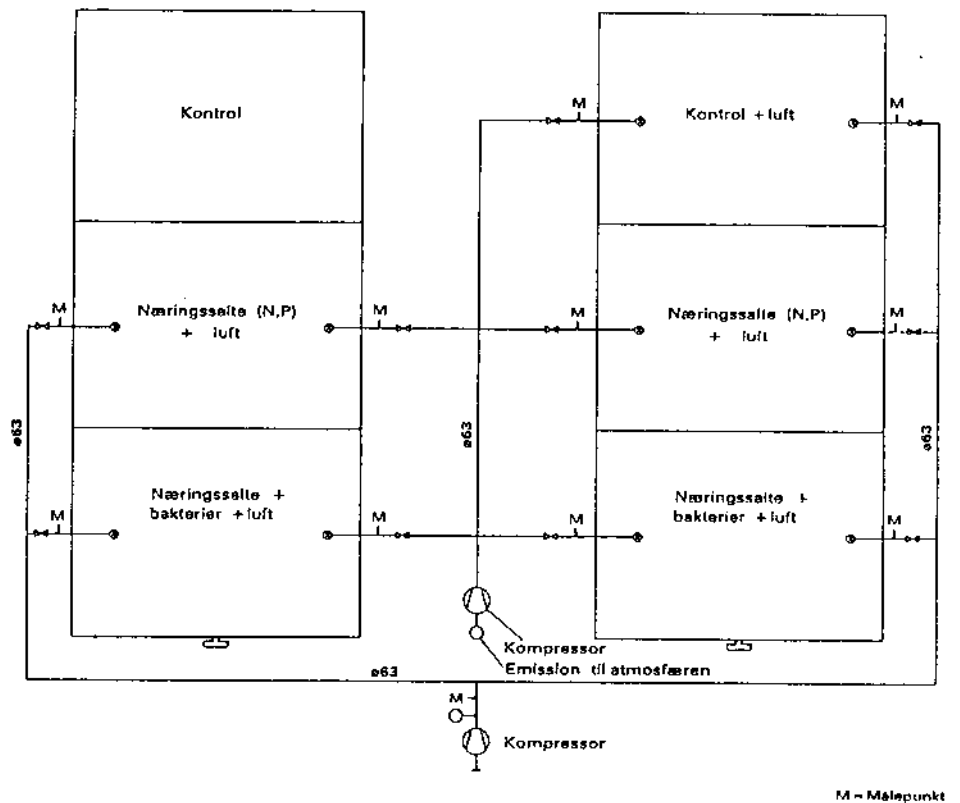
Figur 6.2.2 viser vandsystemet. Postevand blev ledt til 2 tanke og blandet med næringssalte og bakterier. Efter blandingen blev opløsningen pumpet

(med en Grundfos centrifugalpumpe) til de vandrette drænrør øverst i containerne og perkoleret gennem jordmatricen. Efter recirkulation blev opløsningen sluttelig ledt til en spildevandstank. Vandstanden i rummene blev justeret, så de nederste 10-20 cm af jordmatricen var dækket. Der blev udtaget vandprøver fra hvert af rummene for at kontrollere spredningen af næringsalte og bakterier samt udvaskningen af kulbrinter.



Figur 6.2.2
Vandsystemet.

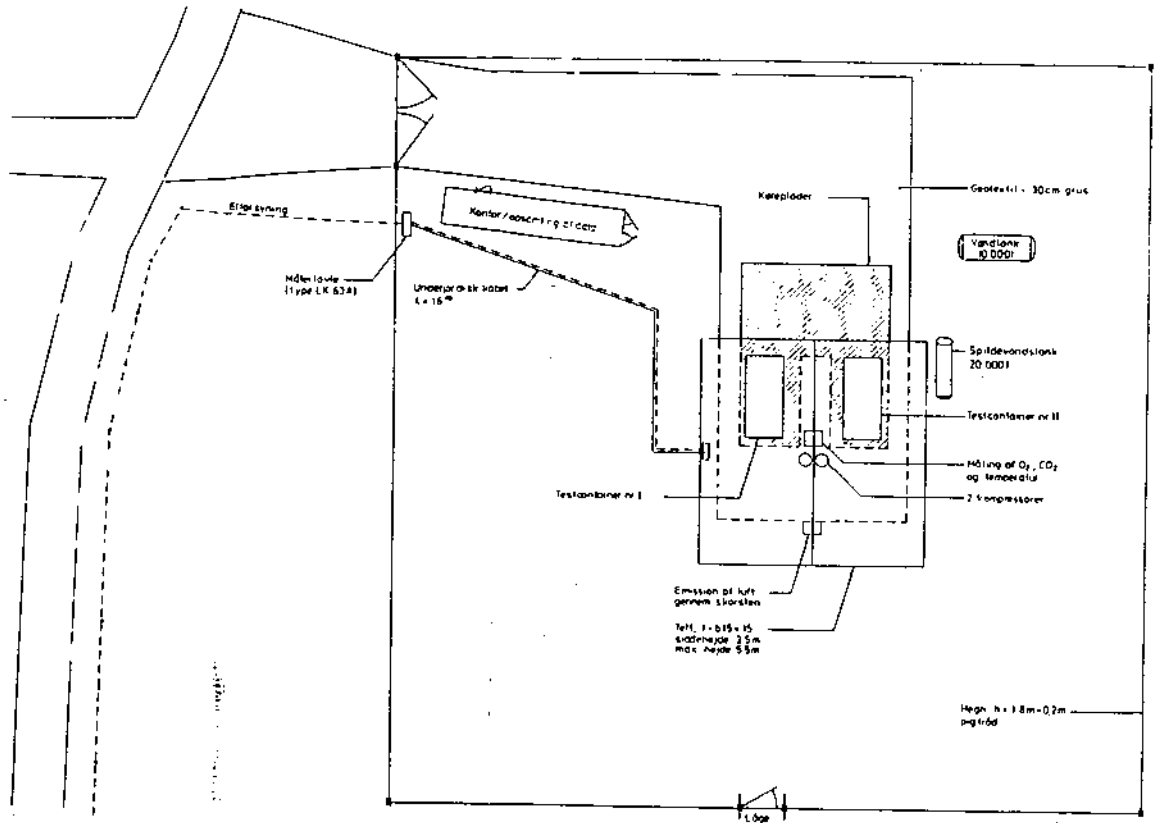
Bioventingsystemet er vist på figur 6.2.3. Efter afdræning af vand fra jordmatricen, påbegyndtes luftinjektionen. Der var installeret en lodret injektionsboring og en lodret vakuumboring i hvert af de 5 rum. Boringerne bestod af et perforeret stålrør omgivet af grus, og hver boring var ca. 2 m dyb og dækkede således jordmatricen i højden. To Siemens kompressorer sørgede for luftinjektion og luftudsugning. Den bortskaffede luft blev ledt ud i atmosfæren gennem en lille skorsten, da målinger af emissionsluften viste, at der kun forefandtes en ubetydelig koncentration af kulbrinter (se appendix 6). Øverst i hvert rum var der placeret en bentonitmembran for at sikre minimering af luftudskiftning gennem overfladen.



Figur 6.2.3
Bioventingsystemet.

Et system til kontinuerlig måling af ilt- og kuldioxidindhold samt temperatur i jorden blev installeret på forsøgsområdet (TEMAC Biogas Surveyor). Luftprøverne blev indsamlet på skift af 24 måleprober, og ilt- og kuldioxidkoncentrationerne blev målt henholdsvis elektrokemisk og ved IR absorption. Temperaturen målt med sensorer placeret 12 forskellige steder. Måledataene blev indsamlet af en computer forbundet med et modem. Placeringen af de 24 måleprober er vist i appendix 7.

Figur 6.2.4 giver et overblik over opbygningen af containeranlægget.



Figur 6.2.4
Situationsplan.

6.2.2 Tilsætning af næringssalte

For at undgå udbredt bakterievækst i nærheden af drænrørene blev næringssalte og bakterier fordelt separat. Næringssaltene blev tilsat først.

Næringssaltene Na_2HPO_4 , NaNO_3 og KNO_3 blev tilsat. I appendix 8 er angivet baggrunden for valget af næringssalte og den nøjagtige mængde af stofferne. Eftersom tilsætning af næringssalte i store koncentrationer kan forårsage et fald i nedbrydningshastigheden (Morgan & Watkinson, 1990), blev næringssaltene tilsat ad 2 omgange.

Hvert af de rum, der fik tilsat næringssalte, modtog derfor næringssalte opløst i 1.400 l vand 2 gange. For at gøre behandlingen i rummene så ens som mulig blev der tilsat den samme mængde vand til de rum, der ikke fik tilsat næringssalte. Efter recirkulation af vandet (lig med 4 porevoluminer) blev jordmatricen afdrænet. En analyse af drænvandet viste kulbrintekonzentrationer nær detektionsgrænsen, og udvaskningen af kulbrinter blev derfor anset for at være uden betydning for faldet i kulbrinter i containerforsøget.

6.2.3 Strategi for inokulering med bakterier

Efter tilsætning af næringssalte inokuleredes jorden med bakterier. Bakterierne, som var opformeret, koncentreret og vasket i laboratoriet blev fortyndet med vand i en tank med omrøring. Koncentrationen af bakterier i opløsningen var 10^8 CFU/ml. Jorden blev inokuleret til et forventet slutkintal på 10^7 CFU/g jord. Bakterieopløsningen blev doseret manuelt ved pumpning. Det var forventet, at de fleste bakterier ville adhædere til jorden, når den blev drænet.

Mængden af tilførte bakterier var et kompromis mellem ønsket om at tilføre en meget stor aktiv olienedbrydende biomasse (et stort inokulum var nødvendigt ifølge batchforsøg: $> 10^8$ CFU/g), og hvad der rent faktisk var muligt i betragtning af problemer med bakterietransport og vandmængde.

For at vurdere fordelingshastigheden af bakterier i containeren blev et laboratoriekolonneforsøg udført, se appendiks 9.

I appendiks 10 er bakteriemængden, der skønnedes nødvendig for inokulering i containerne, beregnet, og systemet for tilsætning af bakterier er beskrevet.

20.000 kg jord (2 rum på hver $6 \text{ m}^3 = 12 \text{ m}^3$ eller 12×10^3 liter jord med en densitet på 1,67 kg/liter) blev inokuleret.

En koncentration på 10^8 CFU/ml i tanke på 2×700 liter pr. beholder svarede til $4 \times 700 \times 10^3 \times 10^8 = 2,9 \times 10^{14}$ CFU i alt. Dette var mere end den minimale mængde på 10^7 CFU/g jord (eller $20.000 \times 10^3 \times 10^7 = 2 \times 10^{14}$ CFU). 4,3 liter koncentrat pr. 700 liter vand med et forventet CFU på $1,7 \times 10^{10}$ eller 4.265 ml koncentrat pr. batch blev indført.

De aktuelle kintal på udspreddningsdagen (der blev aflæst efterfølgende) viste, at der blev spredt $4 \times 4,3 \times 10^3 \times 2,2 \times 10^{10} = 3,8 \times 10^{14}$. Dette svarede til en koncentration i inokuleringsvandet på $1,4 \times 10^8$ CFU/ml og/eller $1,9 \times 10^7$ CFU/g jord.

Bakteriekoncentratet blev opblandet i 700 l vand ved 15 min. omrøring ved 750 rpm. Inokuleringen skete på jord mættet med vand indeholdende næringssalte (afdrænet umiddelbart før inokulering). Påsætningshastigheden var ca. 10 liter/min. Efter påsætning blev der recirkuleret vand i 1 time, ca. $1 \text{ m}^3/\text{h}$. Containerne henstod natten over og dagen efter blev vandet recirkuleret med ca. $1 \text{ m}^3/\text{h}$ i 4 timer, svarende til recirkulering af i alt ca. 4 væskevolumener. Herefter blev containerne afdrænet.

For at evaluere kulturpåsetningen blev der udtaget prøver af recirkuleringsvandet hhv. før og efter kulturpåsetningen.

Tabel 6.2.1
Vandprøver fra containerne.

	Container I beluftning, næringsalte og bakterier CFU/ml	Container II beluftning, næringsalte og bakterier CFU/ml
Før inokulering d. 12.7.	< 10 ⁵	< 10 ⁵
Efter inokulering d. 13.7.	1,36 x 10 ⁸	1,41 x 10 ⁸ *

* hvoraf 4 x 10⁶ havde en morfologi anderledes end D07-II-1.

Containerne blev inokuleret med den tilstræbte mængde kultur af DO7-II-1. Stigningen i CFU i recirkuleringsvandet dagen efter inokuleringen (en mængde svarende til koncentrationen i det inokulerede vand) indikerer, at bakterien er blevet spredt ned gennem containeren, men også at en stor del af bakterierne blev afdrænet med afløbet og altså ikke tilbageholdt af jordpartiklerne. På den anden side var der tegn på, at en betydelig bakteriemængde blev tilbageholdt i jorden efter bortledning, fordi jordprøverne fra beholderne med bakterier tilført føltes mere "klæbrige" og øjensynlig var forskellige fra jordprøver fra de andre beholdere.

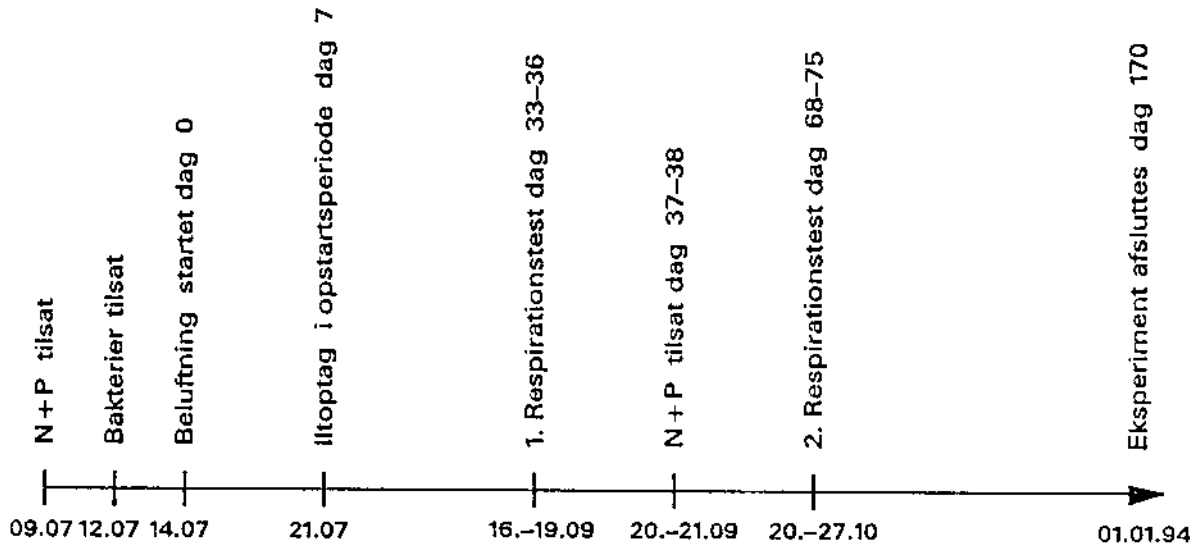
6.3 Forsøgsstrategi

Ud over den kontinuerlige måling af ilt- og kuldioxidindhold samt temperatur blev der regelmæssigt udtaget jordprøver. Der var 90 forskellige prøvetagningssteder i container I og 81 i container II. I løbet af forsøgsperioden blev der udtaget 1 eller 2 jordprøver fra hvert prøvetagningssted.

Jorden blev analyseret for pentanekstraherbare kulbrinter, CFU, vandindhold, pH, NO₃⁻-N og PO₄³⁻-P.

Forsøgsperioden var begrænset til ca. 5 måneder. I løbet af perioden blev der udtaget 18 jordprøver på 10 forskellige dage, hvilket giver 180 prøver i alt. Se appendix 11 vedrørende prøvedata.

Figur 6.3.1 viser forsøgsperioden med henblik på tilsætningen af næringsalte og bakterier samt udførelse af respirationstests.



Figur 6.3.1
Forsøgsperioden.

I henhold til beregningerne i appendix 7 modtog jordmatricen en passende mængde ilt ved en luftudskiftning på 0,16 porevolumen/time. Det blev besluttet at ventilere jordmatricen diskontinuerligt, idet det forventedes, at en sådan beluftning ville sikre en bedre fordeling af luft i jordmatricen. Efter en indledende periode bestod ventilationscyklussen af 45 minutters luftinjektion efterfulgt af 195 minutter uden luftinjektion. Dette garanterede en luftudskiftning på 0,36 porevolumen/time (se appendix 6).

6.4 Analysemetoder

6.4.1 Prøvetagning og behandling af jordprøver

Tre jordprøver på ca. 100 g blev udtaget fra hvert containerrum - 18 prøver i alt - ved hver prøvetagningsrunde. Prøverne blev opbevaret i lufttætte glasflasker med skrue låg. Hvis behandling af prøver ikke kunne sættes i gang samme dag, blev prøverne opbevaret ved 5°C. Prøverne blev altid behandlet inden 12 timer fra prøvetagningstidspunktet (dieselolieindhold) og 42 timer (nitrat- og fosfatindhold). Hver jordprøve blev omhyggeligt blandet og sten blev fjernet, hvorefter prøven blev delt i tre: 50 g til bestemmelse af dieselolieindhold, 20 g til NO_3^- -N og PO_4^{3-} -P-bestemmelse og ca. 5 g til tørvægtsbestemmelse.

6.4.2 Bestemmelse af dieselolieindhold

50 g jord blev ekstraheret med pentan, og dieselolieindholdet blev målt på gaschromatograf. Se appendiks 12 for nærmere beskrivelse.

6.4.3 Tælling af heterotrofe og olienedbrydende bakterier

Bakteriepopulationerne blev bestemt vha. udpladning på agar. Se appendiks 12 for nærmere beskrivelse.

6.4.4 Bestemmelse af nitrat og fosfat

20 g jord blev ekstraheret med KCl. NO_3^- -N og PO_4^{3-} -P blev målt med flow-injektionsmetoden. Se appendiks 12.

6.4.5 Bestemmelse af pH og vandindhold

pH blev målt ifølge Hedegaard (1985).

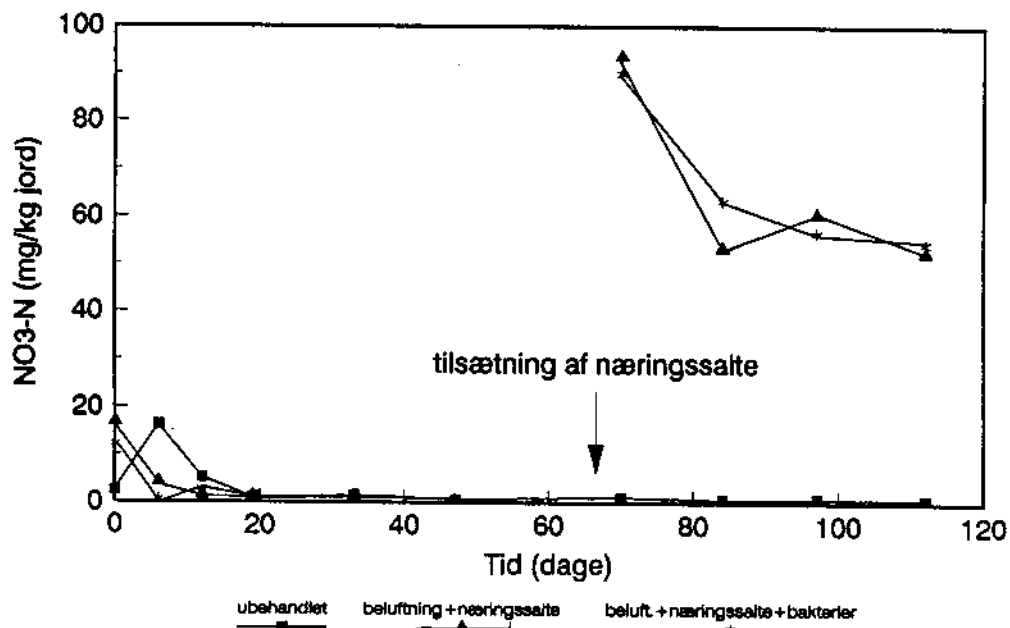
Vandindholdet blev målt ved at genveje jord, der var tørret ved 90°C i 24 timer.

7 Resultater af containerforsøg; diskussion

7.1 Resultater af uorganiske analyser

pH

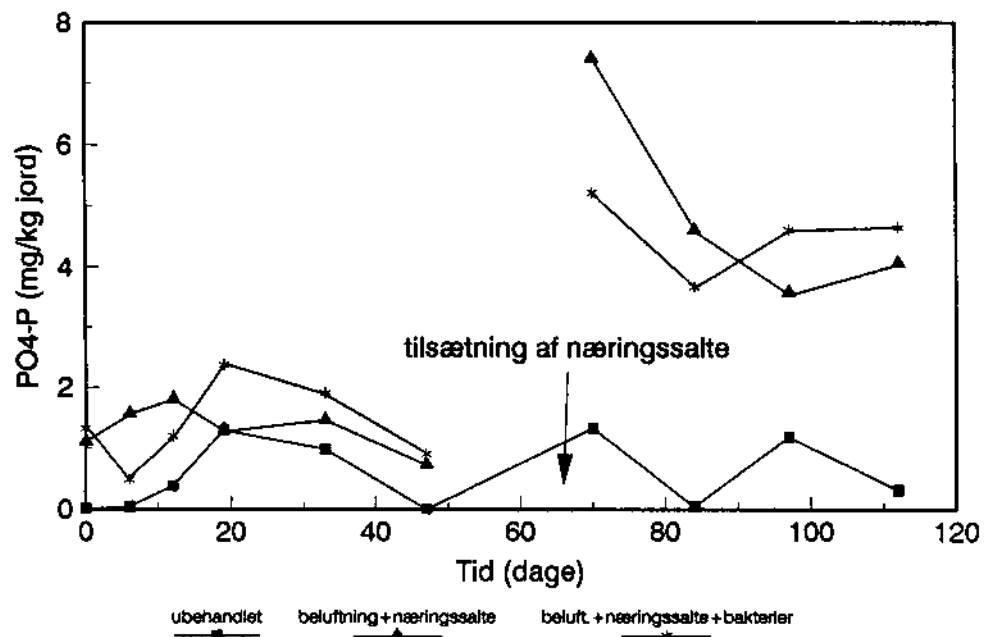
Jordens pH-værdi blev målt 2 gange under containerforsøget. Umiddelbart før udførelsen af bioventing blev pH-værdien målt til 6,8. Ved forsøgets slutning (dag 112) var pH-værdien 7,4.



Figur 7.1.1
NO₃-N målt i container I.

Nitrat og fosfat

Koncentrationen af vandopløseligt nitrogen i jorden i form af nitrat og fosfor i form af orthofosfat blev målt ved hver jordprøveudtagning. Figur 7.1.1 viser indholdet af nitrat og figur 7.1.2 viser indholdet af fosfat-P i jorden i container I. I løbet af forsøgets første 10 dage faldt nitratindholdet i de behandlede rum i container I til nær baggrunds niveau. Faldet i nitratkoncentrationen kan dermed kædes sammen med den hurtige nedbrydning af dieselolie og det øgede iltforbrug i starten af processen.



Figur 7.1.2
 PO_4^{3-} -P målt i container I

Et lignende fald i nitratkoncentrationen kunne konstateres i den periode på 2 uger, der lå umiddelbart efter den anden tilsætning af næringsalte.

Nitrat blev første gang målt dag 0, dvs. en uge efter første tilsætning af næringsalte, og nitratindholdet var da meget lavt sammenlignet med resultater af målinger foretaget umiddelbart efter den anden tilsætning af næringsalte. Bakterier har formodentlig forbrugt nitraten i perioden fra den første tilsætning til dag 0. Det samme mønster med hensyn til forbrug af nitrat sås i container II.

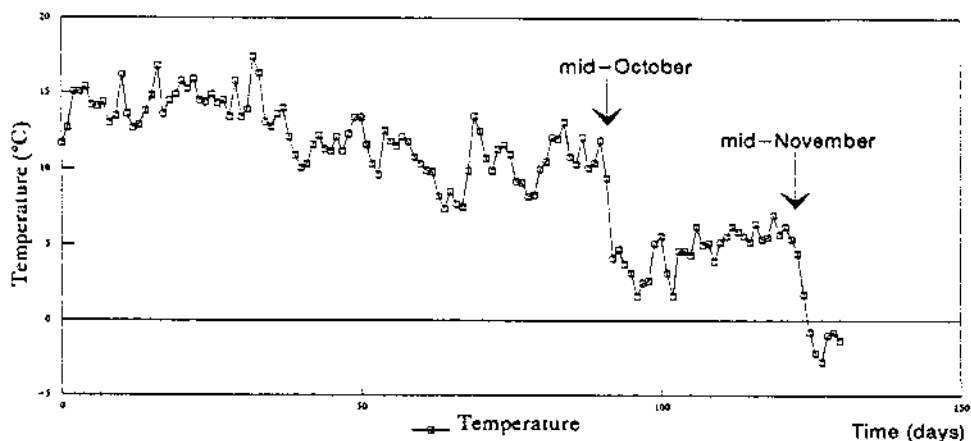
Afdrænet vand fra jordmatrixen blev undersøgt for nitrat og fosfat, og målingerne viste en ubetydelig mængde fosfor i vandet, hvilket betyder, at en stor del af fosfaten blev tilbageholdt i jorden. Nitratkoncentrationen i vandet blev målt til ca. 400 mg/l, hvorfor 30-50% af nitraten blev tilbageholdt i jorden. Ud fra disse beregninger kunne en nitratkoncentration på 50 mg/kg jord forventes efter den første tilsætning af næringsalte.

Temperatur

Temperaturmåleudstyr var installeret ved 12 forskellige målepunkter i containerne. På grund af problemer med udstyret findes der dog først brugbare data efter den 5. oktober 1993. Figur 7.1.3 viser temperaturen målt ved en vejrstation i nærheden af forsøgsområdet i Sørup. Den gennemsnitlige dagtemperatur blev beregnet på basis af temperaturmålinger foretaget med 30 minutters mellemrum. Eftersom containerne var placeret i et telt, formodes temperaturen i containerne at svare til temperaturerne målt på vejrstationen. Af dataene fremgår det, at forsøgstemperaturen er faldet ca. 15°C i løbet af perioden med en sluttemperatur på omkring 0°C.

Følgende gennemsnitstemperaturer blev målt i de perioder, hvor der blev udført respirationstests:

- 21. juli: 14°C
- 17.-19. september: 10°C
- 21.-27. oktober: 2°C



Figur 7.1.3
Gennemsnitlig dagtemperatur målt på vejrstation.

Vandindhold i jorden

Som forklaret i afsnit 6.3 bevirkede bioventing ikke et fald i jordens vandindhold. Det gennemsnitlige vandindhold i de 6 rum er vist i tabel 7.1.1. Afvigelsen i indholdet skyldes forskudt afdræning af vand, idet tilsætningen af vand ikke kunne gøres nøjagtig samtidigt. Harder & Höpner (1991) har undersøgt sammenhængen mellem vandindhold og nedbrydning af kulbrinter (benzin) og har fastslået, at et vandindhold på over $5 \pm 0,5\%$ V/V er tilstrækkeligt til, at nedbrydning kan finde sted. Man har ligeledes påvist, at der opnås identiske nedbrydningshastigheder med et vandindhold mellem $5 \pm 0,5\%$ V/V og $15 \pm 0,5\%$ V/V. På den baggrund forventedes det, at forskellen i jordens vandindhold i de 6 rum ville være uden betydning for nedbrydningshastigheden.

Tabel 7.1.1

Gennemsnitligt vandindhold i jorden (V/V%) ± standardafvigelse i de 6 containerrum under forsøget.

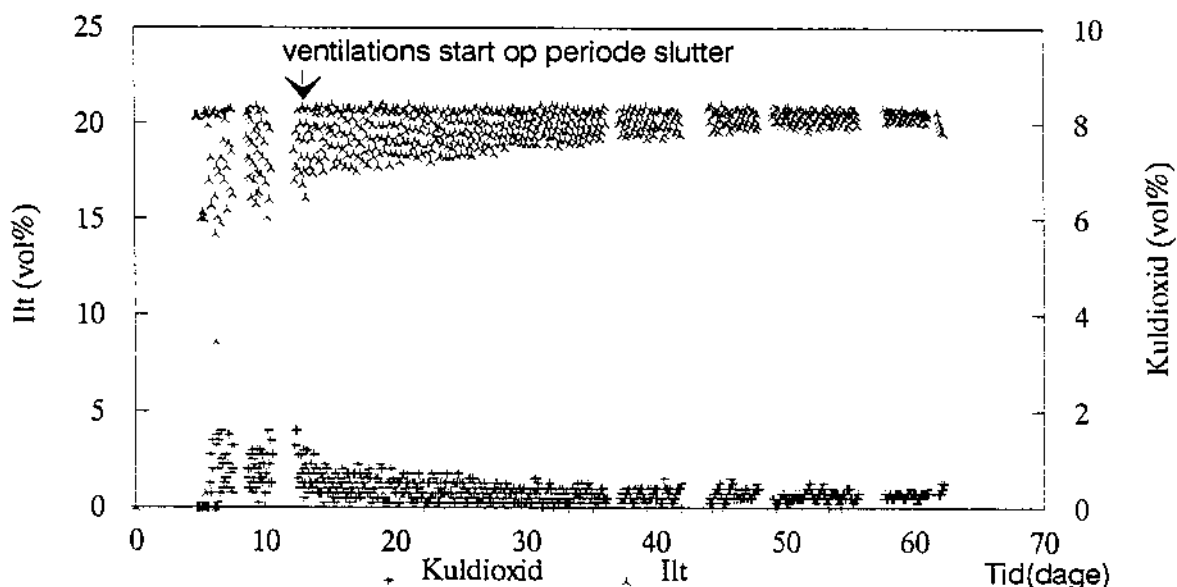
Rum	Cont. I	Cont. I N,P + luft	Cont. I N,P + luft + bakt.	Cont. II Luft	Cont. II N,P + luft	Cont. II N,P + luft + bakt.
Vandindhold V/V %	5,8 ± 1,3	6,4 ± 0,9	7,9 ± 1,7	5,3 ± 0,9	7,1 ± 2,5	8,9 ± 3,7

N, P: Næringssalte
Bakt.: Bakterier

CO₂, O₂

De kontinuerlige målinger af kuldioxid- og iltindhold havde til formål af sikre et stabilt iltniveau i forsøgsperioden. Figur 7.1.4, 7.1.5 og 7.1.6 viser vol % niveauet ved 3 målepunkter i container II. Der er vist en periode fra 0 til 60 dage, idet der i afsnit 7.2 vil blive gjort rede for respirationstestene, som blev udført senere i perioden.

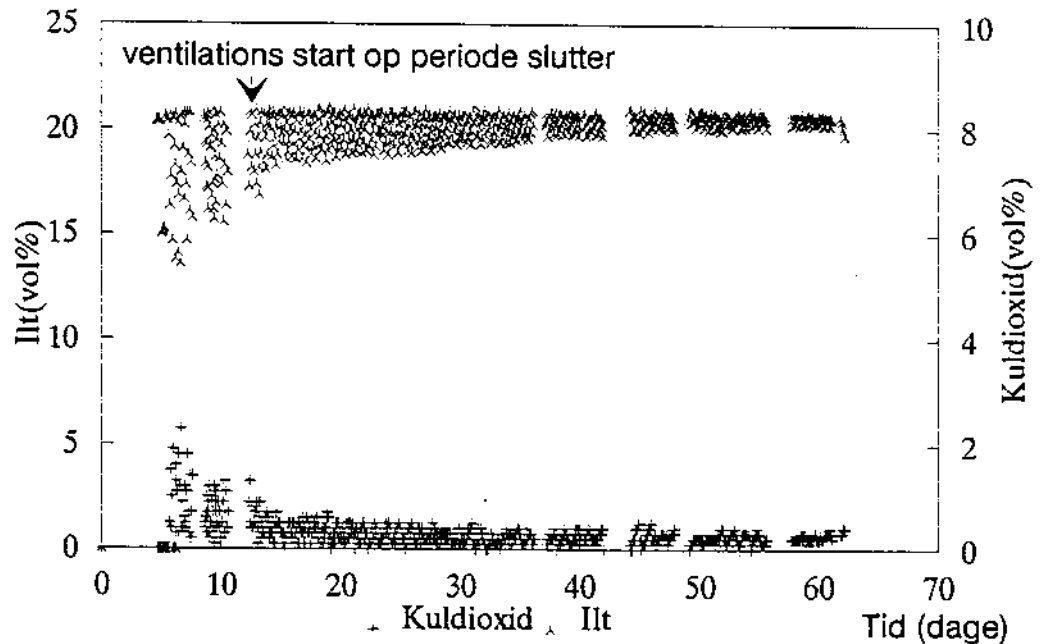
Figur 7.1.4 viser ilt- og kuldioxidniveauet i et rum, der har fået tilsat næringssalte, bakterier og luft. Målepunktet var placeret i bunden af rummet, men resultaterne vist i figur 7.1.4 er repræsentative for alle 4 målepunkter i rummet. Efter en opstartsperiode med lav ventingfrekvens, som resulterede i øget spredning af iltkoncentrationen, stabiliserede iltkoncentrationen sig ved 20 vol % og kuldioxidkoncentrationen ved 0,2-0,3 vol %. De manglende målinger senere i perioden skyldes kalibrering af udstyret og problemer med det elektriske system.



Figur 7.1.4

Ilt- og kuldioxidindhold i et beluftet rum tilsat næringssalte og bakterier.

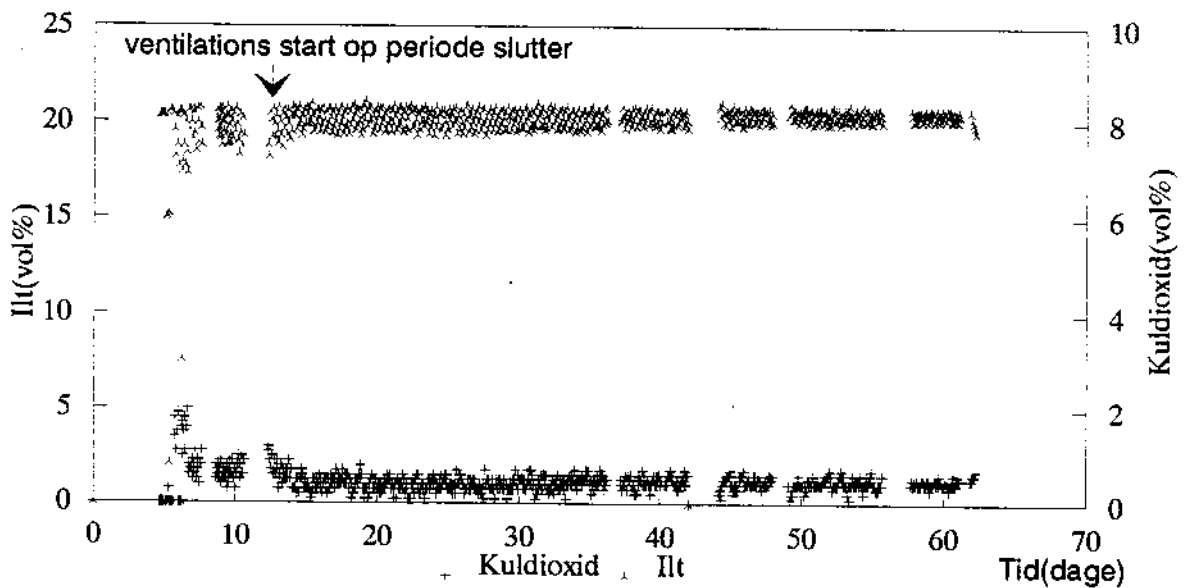
Figur 7.1.5 viser ilt- og kuldioxidniveauet i et rum, der tilsattes nærings-salte og luft. Målepunktet var placeret i bunden af rummet, men resulta-terne vist i figur 7.1.5 er repræsentative for alle 4 målepunkter i rummet. Efter en opstartsperiode med ustabil bioventing, stabiliserede iltkoncentra-tionen sig ved 20 vol % og kuldioxidkoncentrationen ved 0,2-0,3 vol %. De manglende målinger senere i perioden skyldes kalibrering af udstyret og problemer med det elektriske system.



Figur 7.1.5

Ilt- og kuldioxidindhold i et beluftet rum tilsat nærings-salte.

Endelig viser figur 7.1.6 ilt- og kuldioxidniveauet i et rum, der ude-lukkende blev beluftet. Målepunktet var placeret i bunden af rummet, men resultaterne vist i figur 7.1.6 er repræsentative for alle 4 målepunkter i rummet. Efter en opstartsperiode med ustabil bioventing, stabiliserede iltkoncentrationen sig relativt hurtigt ved 20 vol % og kuldioxidkon-centrationen ved 0,2-0,3 vol %. De manglende målinger senere i perioden skyldes kalibrering af udstyret og problemer med det elektriske system.

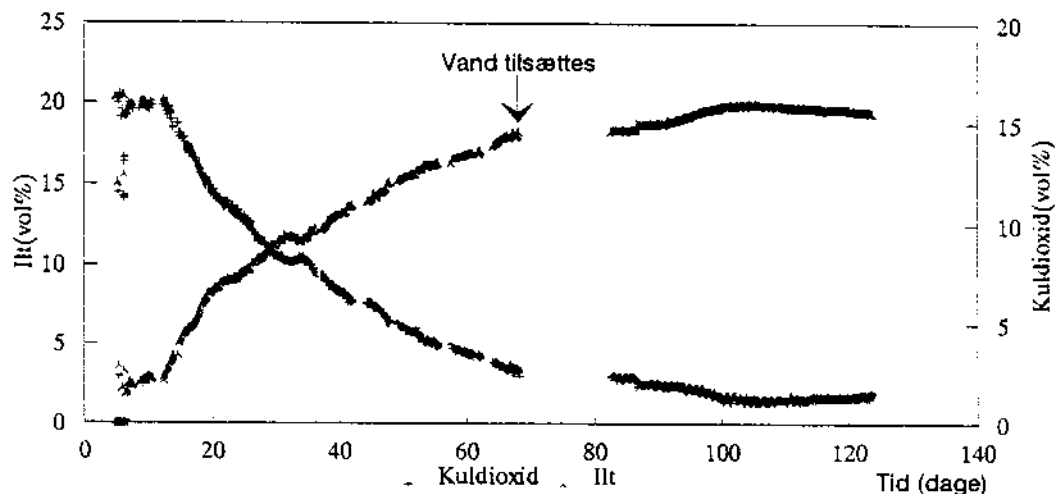


Figur 7.1.6

Ilt- og kuldioxidindhold i et rum, der udelukkende blev beluftet.

Af resultaterne fremgår det, at bioventingen var tilstrækkelig til at skaffe ilt til alle 16 målepunkter i jordmatrixen. Det blev derfor antaget, at bioventingen var tilstrækkelig til at forsyne hele jordmatrixen med ilt.

To målepunkter var anbragt i rummet uden bioventing. Figur 7.1.7 viser resultaterne fra målepunkterne i bunden af dette rum. Disse resultater er repræsentative for begge målepunkter placeret i rummet. Da målingerne startede (dag 5), blev der konstateret et kuldioxidindhold på ca. 16 vol % og et iltindhold på ca. 2 vol %. Baggrunden for disse værdier er, at den biologiske nedbrydning startede allerede i de 5 første dage som følge af tilsætningen af ilt ved opblandingen af jorden. Situationen kompliceredes dog ved, at ilt- og kuldioxidindholdet faldt langsomt i de følgende 60 dage. Iltniveauet stabiliseredes ved 19 vol % og kuldioxidniveauet ved 1,5 vol %. Den langsomme ændring i ilt- og kuldioxidindholdet kan skyldes utilsigtet diffusion på trods af, at der vha. overdækning med bentonit-membran blev taget forholdsregler mod dette.



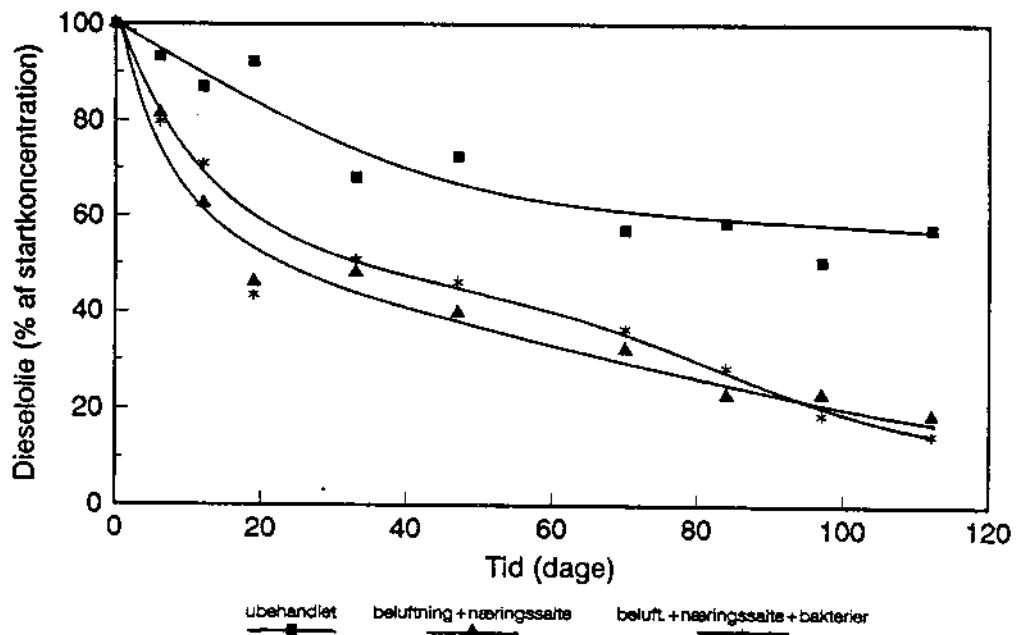
Figur 7.1.7
O₂- og kuldioxidindhold i et rum uden beluftning.

7.2 Nedbrydning af dieselolie

Nedbrydning af dieselolie blev fulgt i de to containere gennem 112 døgn. På grund af de observerede forskelle i nedbrydningsmønstre - især mellem de inokulerede containerrum - blev det besluttet at præsentere data fra de to containere hver for sig.

Når man beskriver nedbrydning af fremmedstoffer i jord, antages det ofte, at nedbrydningen følger en 1. ordens nedbrydningskinetik. Men nedbrydningen af en kompleks blanding af stoffer som dieselolie følger ikke en sådan simpel form for kinetik (Song et al., 1990), idet de enkelte stoffer i blandingen typisk vil blive nedbrudt med forskellige hastigheder. Dette forandrer sammensætningen af blandingen, hvilket nedsætter den samlede nedbrydningshastighed. Dette vil til en vis grad blive modvirket af et skift i den bakterielle population hen imod bakterier, der er i stand til at nedbryde de mere tungnedbrydelige dele af olien. Som en konsekvens af dette kan nedbrydningskonstanten dvs. halveringstiden ikke bestemmes af nedbrydningskurverne. Song et al. (1990) opgiver halveringstiden for dieselolie i jord-mikrokosmos som den tid, det tager at reducere olieindholdet til 50% af startværdien. I nærværende rapport er nedbrydningskurverne derfor tegnet uden, at der ligger en antagelse om, at nedbrydningen følger en 1. ordens kinetik til grund.

Figur 7.2.1 og 7.2.2 viser nedbrydning af dieselolie i containerforsøget.

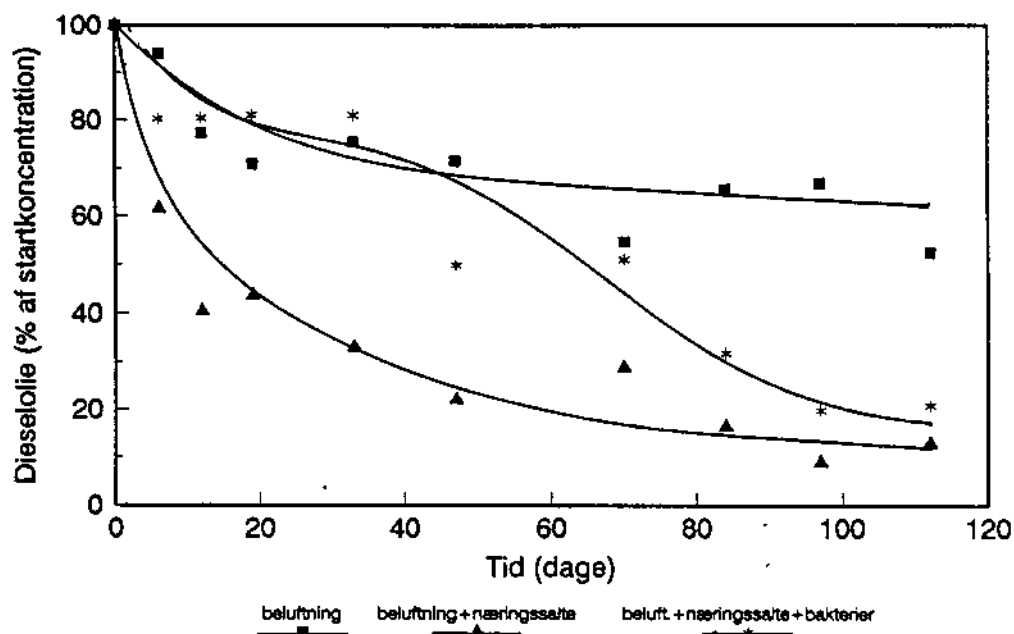


Figur 7.2.1
Dieselolienedbrydning i container I.

Container I

Figur 7.2.1 viser dieselolienedbrydningen i container I. Dieselolienedbrydningen i de to behandlede rum fulgte det samme mønster. I løbet af de første 20 døgn blev ca. 50% af den oprindelige dieselolie nedbrudt, hvorefter nedbrydningshastigheden aftog, således at ca. 20% af den oprindelige dieseloliemængde var tilbage efter 112 døgn. Totalt blev der nedbrudt ca. 1.600 mg dieselolie/kg jord. Det laveste indhold af dieselolie, der blev målt i container I, var 236 mg dieselolie/kg jord. Dette blev målt i en prøve fra det inokulerede containerrum efter 112 døgn.

I det ubehandlede containerrum - kontrollen - skete der også nedbrydning af dieselolie, men med langt lavere hastighed, således at dieseloliekoncentrationen endte på ca. 60% af det oprindelige indhold.



Figur 7.2.2
Dieselolienedbrydning i container II.

Container II

Figur 7.2.2 viser dieselolienedbrydningen i container II. Nedbrydningen af dieselolie i det beluftede rum, som var tilsat næringssalte, fulgte det samme mønster som det tilsvarende rum i container I. Den hurtige nedbrydning i starten efterfulgtes af en meget langsommere nedbrydningshastighed, som endte med, at ca. 20% af den oprindelige dieselolie var tilbage efter 112 døgn. Nedbrydningen af dieselolie i det inokulerede rum var - i modsætning til forløbet i container I - delvis sat i stå i de første 37 døgn, hvorefter nedbrydningen startede, således at dieseloliekoncentrationen endte på ca. det samme niveau efter 112 døgn som i de andre behandlede containerrum.

Sammenligning mellem container I og container II

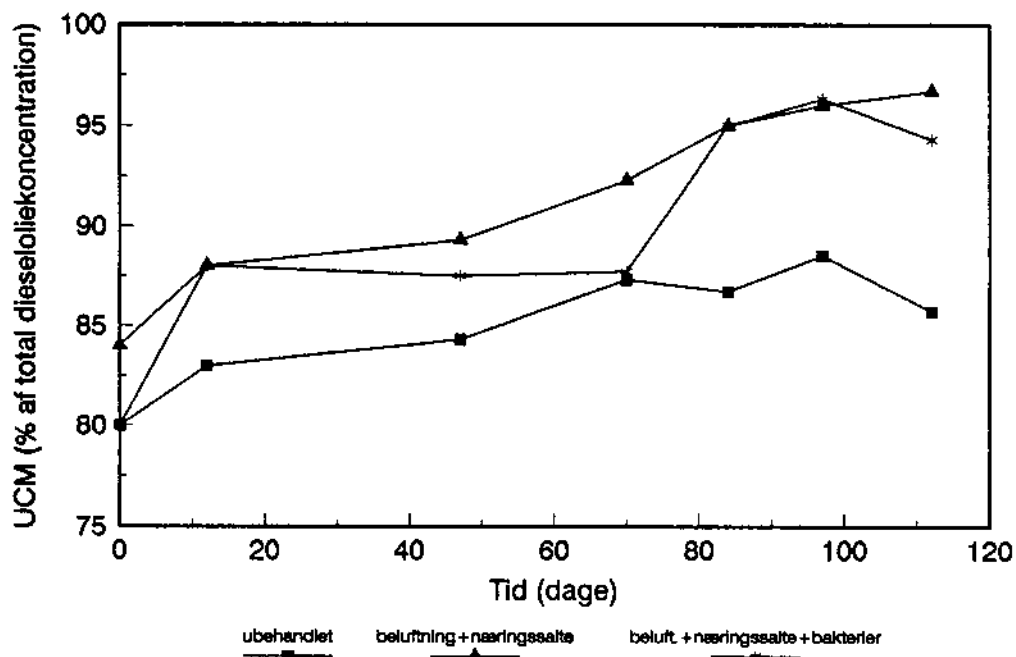
Det laveste indhold af dieselolie målt i container II var 251 mg dieselolie/kg jord, som blev målt i en prøve fra det beluftede og inokulerede containerrum efter 97 døgn. Dieselolienedbrydningen i det beluftede containerrum, som ikke blev tilsat næringssalte, var meget lig den nedbrydning, som sås i det ubehandlede rum i container I. Efter et indledende fald i dieselolieindholdet aftog nedbrydningshastigheden, således at ca. 60% af det oprindelige indhold af dieselolie var tilbage efter 112 døgn. Dieseloliekoncentrationen i alle jordprøver taget under containerforsøget kan ses i appendiks 15. Variationskoefficienterne beregnet ud fra data fra de enkelte containerrum var på gennemsnitligt 21%. Den mindste variationskoefficient var 1,1% i det ubehandlede rum i container I efter 112 døgn,

og den største var på 57,4% ved dag 0 i det beluftede rum tilsat nærings-salte i container II.

Indledende forsøg (se afsnit 5.2.2) viste, at dieselolie nedbrydningen i forsøgsjorden var begrænset af den tilgængelige mængde af nitrat og fosfat. Den første tilsætning af nærings-salte (dag 0) fremmede nedbrydningen sammenlignet med nedbrydningen i det containerrum, som kun blev beluftet; men den anden tilsætning af nærings-salte (dag 37) så ikke ud til at have nogen indflydelse på forløbet af nedbrydningskurverne.

Unresolved complex mixture "UCM"

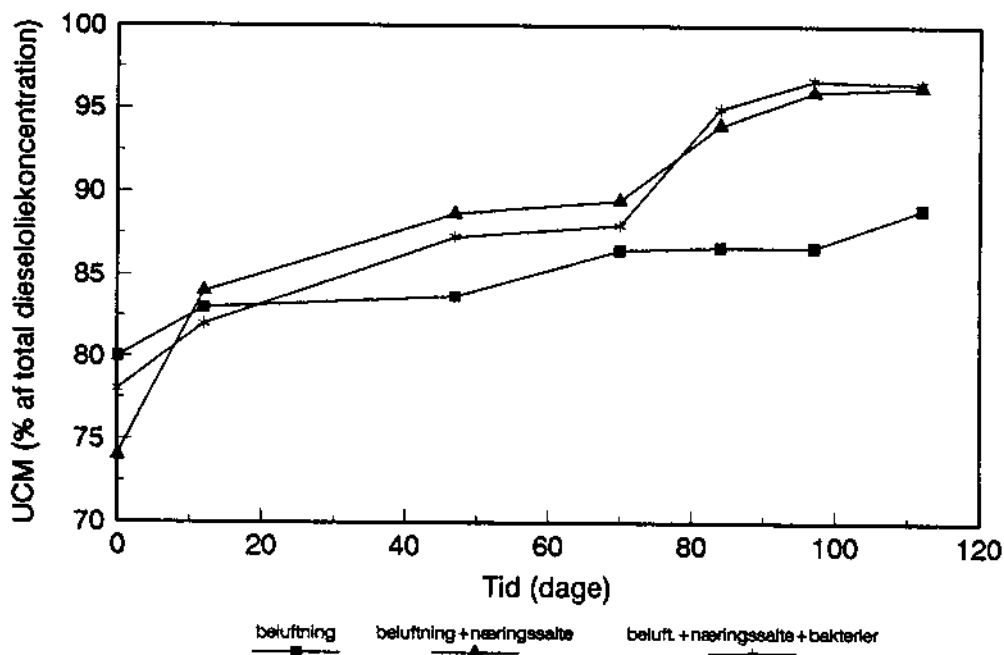
Figur 7.2.3 og 7.2.4 viser kvalitative aspekter ved dieselolie nedbrydningen i containerne. Ved at reintegrere data er det muligt at opsplitte totalarealerne under chromatogrammerne i to. Den ene del indeholder de opløste toppe, dvs. alle toppe som "stikker frem" på chromatogrammerne, af hvilke de mest fremtrædende er ligekædede alkaner og isoprenoiderne pristan og phytan. Den anden del indeholder en kompleks blanding af stoffer, som ikke kan adskilles på chromatogrammerne ("unresolved complex mixture" forkortet UCM). I nærværende projekt blev UCM således defineret som den del, der ikke "stak ud" på chromatogrammerne.



Figur 7.2.3
"Unresolved complex mixture" (UCM) i container I.

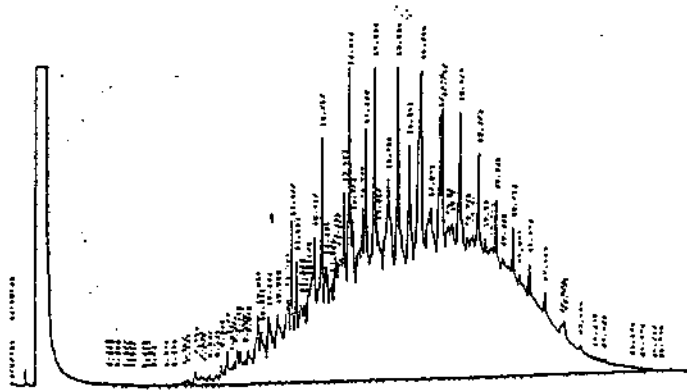
Figur 7.2.3 viser UCM-andelen som procent af det totale dieselolieindhold i container I. I de rum, som blev behandlet steg UCM-andelen til mere end 95% af dieselolieindholdet under eksperimentets gang, mens

UCM-andelen i kontrollen kun steg til ca. 85% af det totale dieselolieindhold. På denne måde ændredes sammensætningen af dieselolien under forsøgets forløb, således at den resterende dieselolie i de behandlede containerrum næsten udelukkende bestod af UCM.

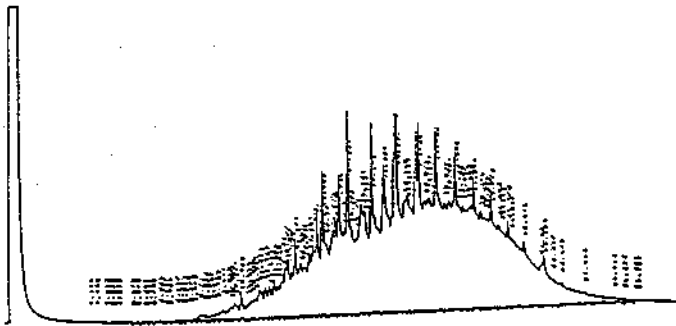


Figur 7.2.4
 "Unresolved complex mixture" (UCM) i container II.

Figur 7.2.4 viser UCM-andelen som procent af det totale dieselolieindhold i container II. Det var ikke muligt at se nogen forskel på UCM-andelene i det inokulerede rum og det rum, som modtog næringsalte. UCM-andelen af dieselolien i det containerrum, som udelukkende blev beluftet, var sammenlignelig med UCM-andelen i det ubehandlede rum i container I. På samme måde fulgte UCM-andelene i de to andre containerrum det samme mønster, som sås i de tilsvarende rum i container I.



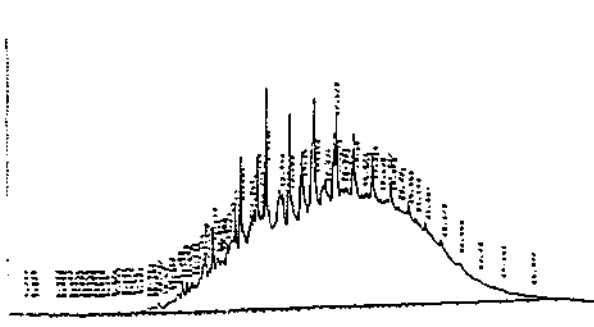
Ubehandlet, dag 0



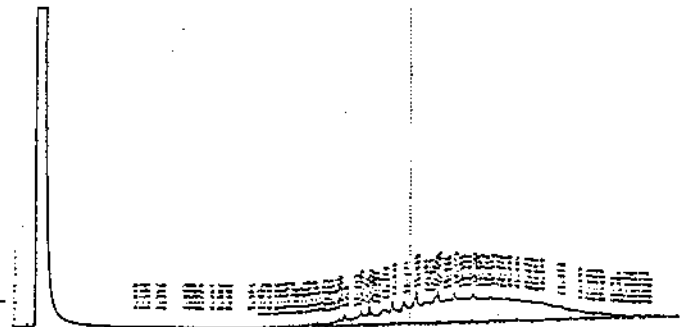
Ubehandlet, dag 112



Beluftning og næringssalte, dag 112



Beluftning, dag 112



Beluftning, næringssalte og bakterier, dag 112

Figur 7.2.5

Chromatografiske profiler af jordprøver fra containerrum udsat for forskellige behandlinger.

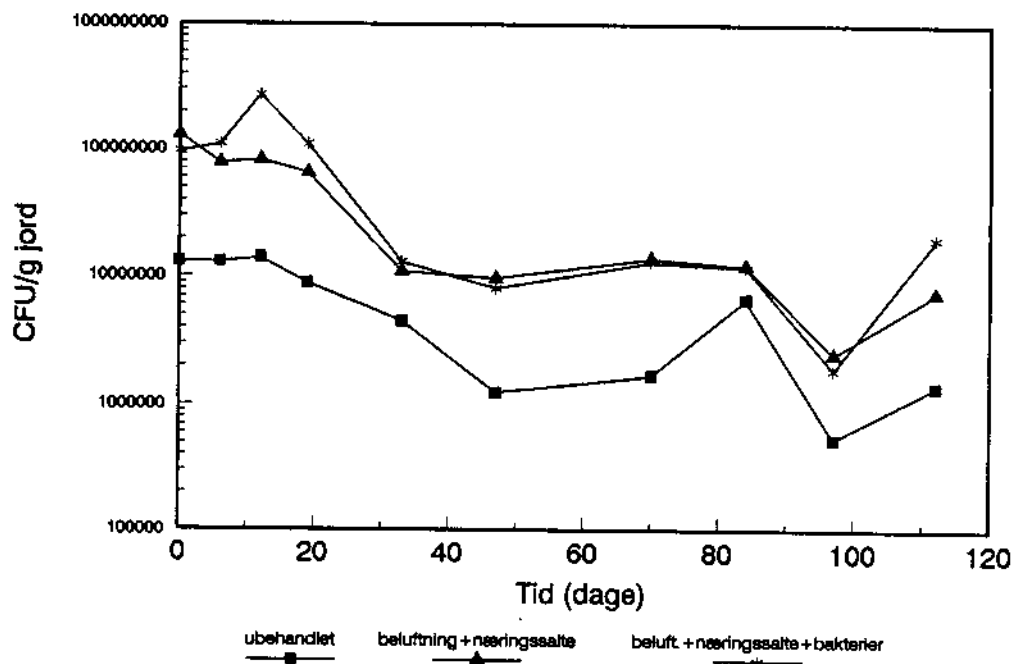
Chromatogrammer, som viser både kvantitative og kvalitative aspekter ved dieselolienedbrydningen i containerforsøget, ses på figur 7.2.5. Chromatogrammerne illustrerer skiftet i oliesammensætning fra olie med et stort indhold af ligekædede alkaner til olie, som næsten udelukkende bestod af UCM-delen af dieselolie.

Det bemærkes, at selvom isoprenoiderne pristan og phytan blev nedbrudt i høj grad, var det stadig muligt at identificere dem på chromatogrammerne efter 112 døgn.

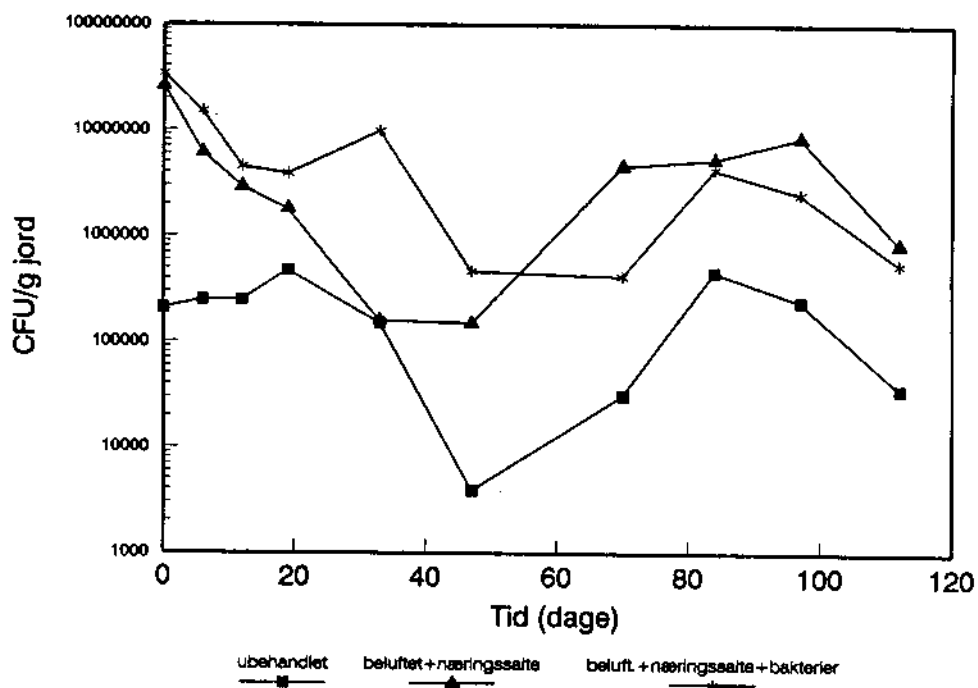
Skiftet i oliesammensætning henimod en større andel af UCM, som sås i containerforsøget, ses typisk i forbindelse med biologisk olienedbrydning af komplekse blandinger af kulbrinter (Gough & Rowland, 1990). UCM-andelen anses almindeligvis for at bestå af polyaromatiske kulbrinter, cykliske forbindelser og kraftigt forgrenede alkaner, selvom en ny undersøgelse tyder på, at T-grenede alkaner muligvis udgør den største del (Gough & Rowland, 1990). Nedbrydningen af de grenede alkaner pristan og phytan, som observeredes i containerforsøget, synes ikke umiddelbart at støtte denne teori. Under alle omstændigheder må dieseloliens sammensætning antages at ændres, således at de mere tungtnedbrydelige kulbrinter udgør en relativt større andel.

En forklaring på den langsomme nedbrydning af dele af olien kunne være, at der manglede substrater, som var nødvendige for at cooxidative processer kunne forløbe. Bakterier, som er i stand til at udnytte polyaromatiske kulbrinter med mere end 4 ringe som eneste kulstof- og energikilde, er først blevet isoleret for nylig (Mueller et al., 1990); men hvis polyaromater som phenanthren er til stede, kan nedbrydning af højere polyaromater som benzo(a)pyren finde sted, sandsynligvis ved cooxidative processer (Keck et al., 1989).

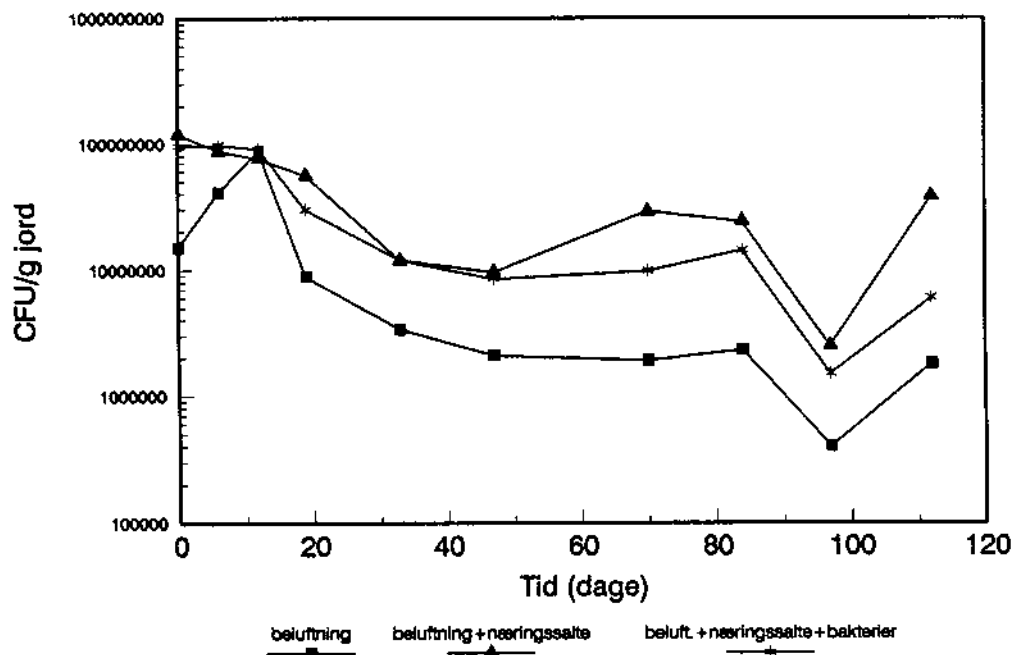
Graden af biologisk tilgængelighed er en anden faktor, som influerer på nedbrydning af fremmedstoffer i jord. Kulbrinter, som er adsorberet til jordpartikler, anses for at være utilgængelige for mikrobiel nedbrydning, selvom evnen til at fremkalde desorption og derved frigøre naphthalen, således at stoffet kunne nedbrydes, viste sig at være organisme-specifik (Guerin & Boyd, 1992). På denne måde kan et adsorberet substrat tænkes at være tilgængeligt for én mikroorganisme, men utilgængeligt for en anden, hvilket gør forudsigelser af effekten af adsorption til jord vanskelig.



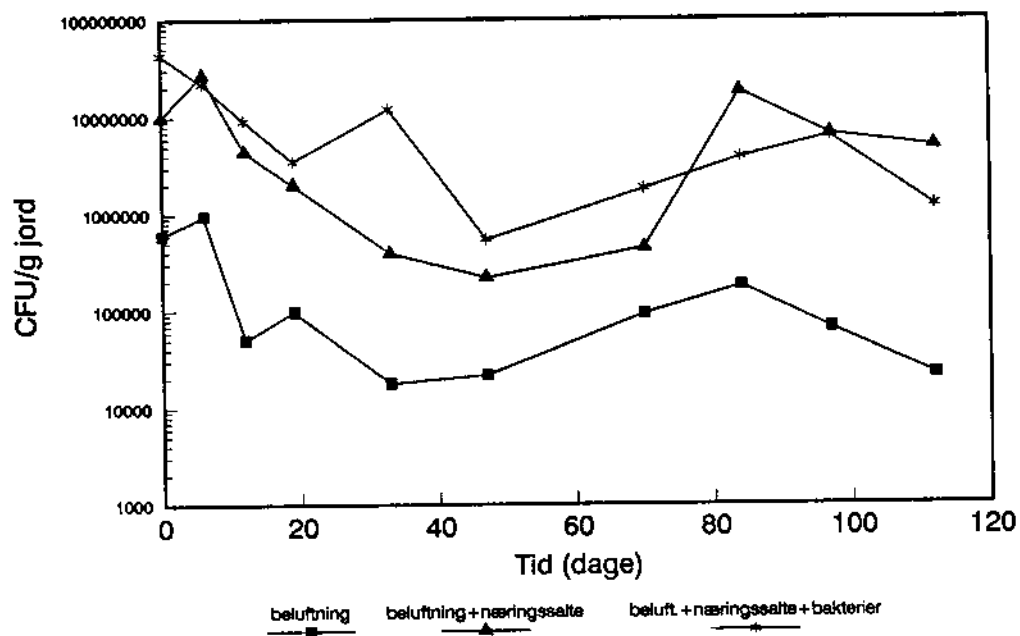
Figur 7.2.6
Det totale antal af heterotrofe bakterier i container I.



Figur 7.2.7
Antallet af olienedbrydende bakterier i container I.



Figur 7.2.8
Det totale antal af heterotrofe bakterier i container II.



Figur 7.2.9
Antallet af olienedbrydende bakterier i container II.

Mikrobiologi

Figur 7.2.6 til 7.2.9 afbilder det totale antal af heterotrofe bakterier og olienedbrydende bakterier - talt som "colony forming units" (CFU) på agarplader - i containerne under eksperimentets forløb. Den forskel, som sås i antal af både heterotrofe og olienedbrydende bakterier i de forskellige containerrum ved forsøgets start, skyldtes sandsynligvis, at næringssalte blev tilsat før dag 0, hvilket gav mulighed for en bakteriel berigelse. Der kunne ikke erkendes nogen effekt af inokuleringen ved målingen dag 0, hverken i antallet af olienedbrydende eller heterotrofe bakterier. Dette var ikke uventet mht. tælling af heterotrofe bakterier, da inokulumstørrelsen kun var ca. $1,9 \times 10^7$ bakterier/g jord. Men på samme måde umuliggjordes detektion af de tilsatte bakterier vha. deres olienedbrydende evne pga. det høje antal af indigene olienedbrydende bakterier målt ved dag 0.

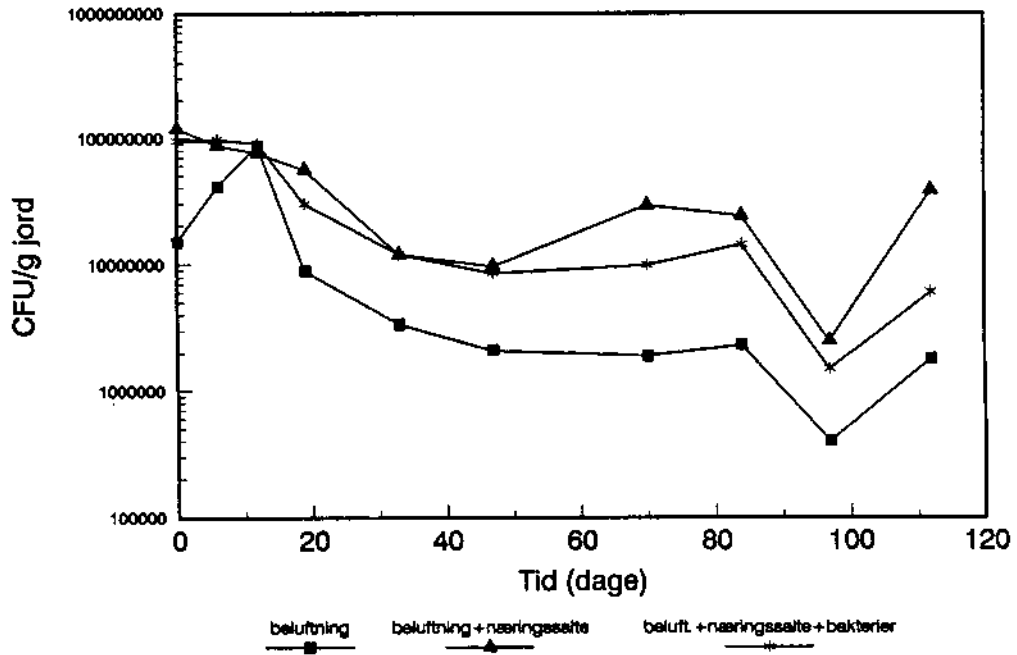
Der sås ikke nogen nettovækst i antallet af hverken heterotrofe eller olienedbrydende bakterier i løbet af forsøget, skønt en forholdsvis stor mængde dieselolie blev nedbrudt. Nedbrydning af 1.600 mg dieselolie/kg jord skulle teoretisk kunne understøtte fremvæksten af $6,8 \times 10^9$ bakterier/g jord (under antagelse af at kulstofindholdet i dieselolie var 85%, at vækstudbyttet var 50% samt at det gennemsnitlige tørstofindhold pr. bakterie var 1×10^{-13} g). I stedet sås et fald i antallet af bakterier, som viste, at nedbrydning af dieselolie kunne ske uden at en samtidig ophobning af biomasse fandt sted. Et tilsvarende mønster er beskrevet af Song & Bartha (1990), som rapporterede, at der skete en indledende vækst i den mikrobielle bestand i forbindelse med en forurening bestående af jetbrændstof, hvorefter antallet af bakterier langsomt aftog efter 4 uger, selvom nedbrydningen stadig fortsatte.

Bossert et al. (1984) var ikke i stand til at korrelere bortskaffelsen af olielam med mineralisering af kulstof (kuldioxid-emission) i slutfasen af et bioremedieringsforsøg. De konkluderede, at dette fænomen skyldtes omdannelse af olie til ikke-ekstraherbart organisk stof, dvs. humusdannelse. Da det ikke i containerforsøget blev undersøgt, om der ophobedes nedbrydningsprodukter, kan det ikke udelukkes, at humusdannelse i stedet for mineralisering og indbyggelse i biomasse fandt sted, hvilket kunne forklare den manglende biomassetilvækst.

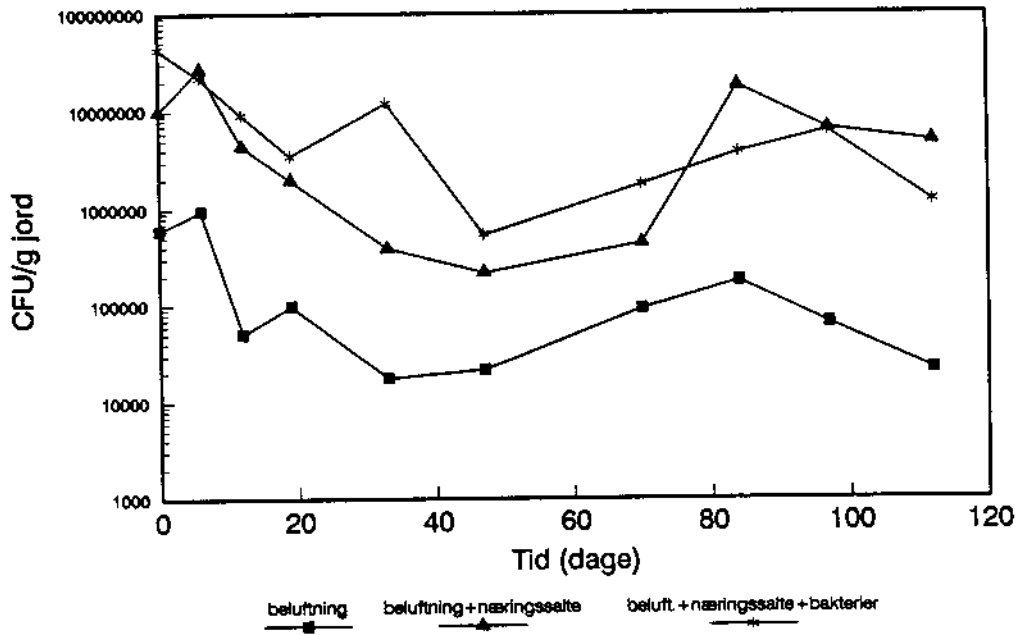
Der kan drages to hovedkonklusioner om dieselolienedbrydning af resultaterne af containerforsøget:

- En kombination af beluftning og samtidig tilsætning af nærings-salte fremmede signifikant nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med en ubehandlet kontrol.
- Inokulering med bakterier fremmede *ikke* nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med samtidig beluftning og tilsætning af nærings-salte.

En litteratursøgning bragte ingen artikler frem, som rapporterede en signifikant positiv effekt af at inokulere olieforureninger. Dette er i



Figur 7.2.8
Det totale antal af heterotrofe bakterier i container II.



Figur 7.2.9
Antallet af olienedbrydende bakterier i container II.

Mikrobiologi

Figur 7.2.6 til 7.2.9 afbilder det totale antal af heterotrofe bakterier og olienedbrydende bakterier - talt som "colony forming units" (CFU) på agarplader - i containerne under eksperimentets forløb. Den forskel, som sås i antal af både heterotrofe og olienedbrydende bakterier i de forskellige containerrum ved forsøgets start, skyldtes sandsynligvis, at næringssalte blev tilsat før dag 0, hvilket gav mulighed for en bakteriel berigelse. Der kunne ikke erkendes nogen effekt af inokuleringen ved målingen dag 0, hverken i antallet af olienedbrydende eller heterotrofe bakterier. Dette var ikke uventet mht. tælling af heterotrofe bakterier, da inokulumstørrelsen kun var ca. $1,9 \times 10^7$ bakterier/g jord. Men på samme måde umuliggjordes detektion af de tilsatte bakterier vha. deres olienedbrydende evne pga. det høje antal af indigene olienedbrydende bakterier målt ved dag 0.

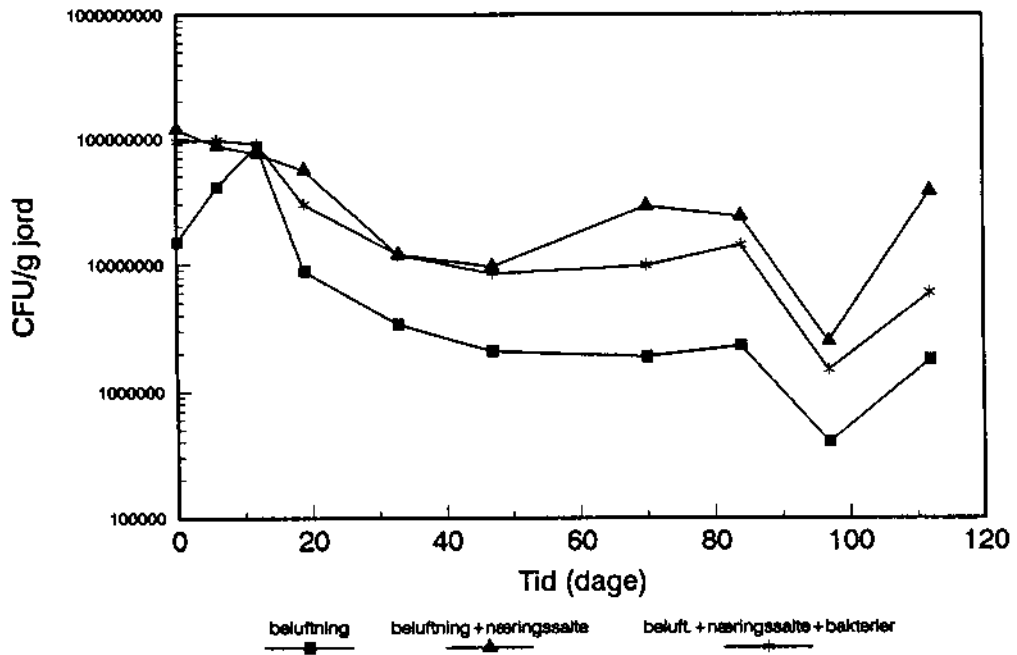
Der sås ikke nogen nettovækst i antallet af hverken heterotrofe eller olienedbrydende bakterier i løbet af forsøget, skønt en forholdsvis stor mængde dieselolie blev nedbrudt. Nedbrydning af 1.600 mg dieselolie/kg jord skulle teoretisk kunne understøtte fremvæksten af $6,8 \times 10^9$ bakterier/g jord (under antagelse af at kulstofindholdet i dieselolie var 85%, at vækstudbyttet var 50% samt at det gennemsnitlige tørstofindhold pr. bakterie var 1×10^{-13} g). I stedet sås et fald i antallet af bakterier, som viste, at nedbrydning af dieselolie kunne ske uden at en samtidig ophobning af biomasse fandt sted. Et tilsvarende mønster er beskrevet af Song & Bartha (1990), som rapporterede, at der skete en indledende vækst i den mikrobielle bestand i forbindelse med en forurening bestående af jetbrændstof, hvorefter antallet af bakterier langsomt aftog efter 4 uger, selvom nedbrydningen stadig fortsatte.

Bossert et al. (1984) var ikke i stand til at korrelere bortskaffelsen af olieslam med mineralisering af kulstof (kuldioxid-emission) i slutfasen af et bioremedieringsforsøg. De konkluderede, at dette fænomen skyldtes omdannelse af olie til ikke-ekstraherbart organisk stof, dvs. humusdannelse. Da det ikke i containerforsøget blev undersøgt, om der ophobedes nedbrydningsprodukter, kan det ikke udelukkes, at humusdannelse i stedet for mineralisering og indbyggelse i biomasse fandt sted, hvilket kunne forklare den manglende biomassetilvækst.

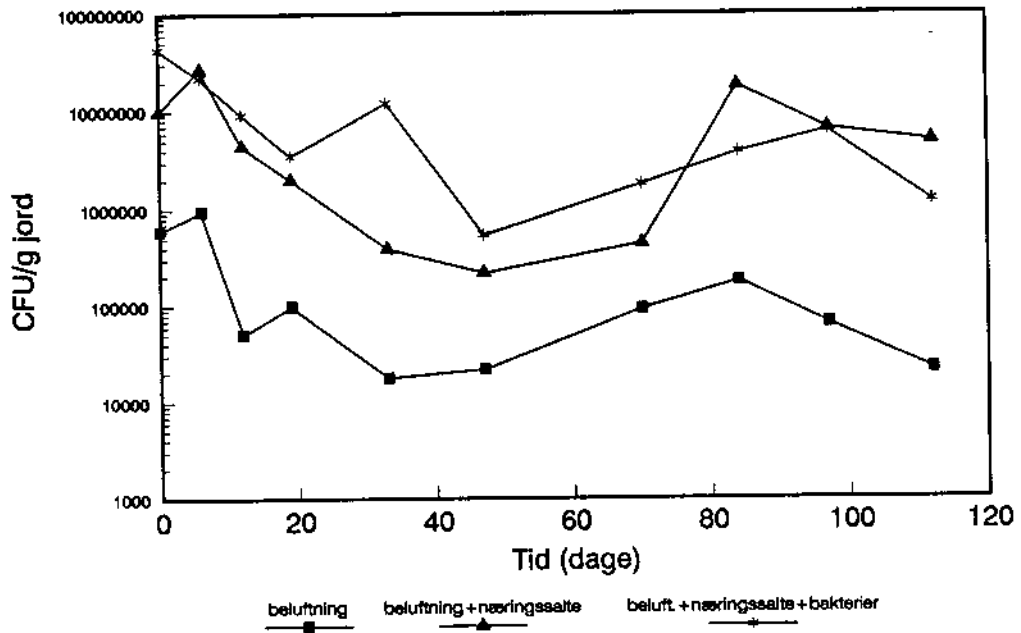
Der kan drages to hovedkonklusioner om dieselolienedbrydning af resultaterne af containerforsøget:

- En kombination af beluftning og samtidig tilsætning af næringssalte fremmede signifikant nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med en ubehandlet kontrol.
- Inokulering med bakterier fremmede *ikke* nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med samtidig beluftning og tilsætning af næringssalte.

En litteratursøgning bragte ingen artikler frem, som rapporterede en signifikant positiv effekt af at inokulere olieforureninger. Dette er i



Figur 7.2.8
Det totale antal af heterotrofe bakterier i container II.



Figur 7.2.9
Antallet af olienedbrydende bakterier i container II.

Mikrobiologi

Figur 7.2.6 til 7.2.9 afbilder det totale antal af heterotrofe bakterier og olienedbrydende bakterier - talt som "colony forming units" (CFU) på agarplader - i containerne under eksperimentets forløb. Den forskel, som sås i antal af både heterotrofe og olienedbrydende bakterier i de forskellige containerrum ved forsøgets start, skyldtes sandsynligvis, at næringssalte blev tilsat før dag 0, hvilket gav mulighed for en bakteriel berigelse. Der kunne ikke erkendes nogen effekt af inokuleringen ved målingen dag 0, hverken i antallet af olienedbrydende eller heterotrofe bakterier. Dette var ikke uventet mht. tælling af heterotrofe bakterier, da inokulumstørrelsen kun var ca. $1,9 \times 10^7$ bakterier/g jord. Men på samme måde umuliggjordes detektion af de tilsatte bakterier vha. deres olienedbrydende evne pga. det høje antal af indigene olienedbrydende bakterier målt ved dag 0.

Der sås ikke nogen nettovækst i antallet af hverken heterotrofe eller olienedbrydende bakterier i løbet af forsøget, skønt en forholdsvis stor mængde dieselolie blev nedbrudt. Nedbrydning af 1.600 mg dieselolie/kg jord skulle teoretisk kunne understøtte fremvæksten af $6,8 \times 10^9$ bakterier/g jord (under antagelse af at kulstofindholdet i dieselolie var 85%, at vækstudbyttet var 50% samt at det gennemsnitlige tørstofindhold pr. bakterie var 1×10^{-13} g). I stedet sås et fald i antallet af bakterier, som viste, at nedbrydning af dieselolie kunne ske uden at en samtidig ophobning af biomasse fandt sted. Et tilsvarende mønster er beskrevet af Song & Bartha (1990), som rapporterede, at der skete en indledende vækst i den mikrobielle bestand i forbindelse med en forurening bestående af jetbrændstof, hvorefter antallet af bakterier langsomt aftog efter 4 uger, selvom nedbrydningen stadig fortsatte.

Bossert et al. (1984) var ikke i stand til at korrelere bortskaffelsen af olieslam med mineralisering af kulstof (kuldioxid-emission) i slutfasen af et bioremedieringsforsøg. De konkluderede, at dette fænomen skyldtes omdannelse af olie til ikke-ekstraherbart organisk stof, dvs. humusdannelse. Da det ikke i containerforsøget blev undersøgt, om der ophobedes nedbrydningsprodukter, kan det ikke udelukkes, at humusdannelse i stedet for mineralisering og indbyggelse i biomasse fandt sted, hvilket kunne forklare den manglende biomassetilvækst.

Der kan drages to hovedkonklusioner om dieselolienedbrydning af resultaterne af containerforsøget:

- En kombination af beluftning og samtidig tilsætning af nærings-salte fremmede signifikant nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med en ubehandlet kontrol.
- Inokulering med bakterier fremmede *ikke* nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med samtidig beluftning og tilsætning af nærings-salte.

En litteratursøgning bragte ingen artikler frem, som rapporterede en signifikant positiv effekt af at inokulere olieforureninger. Dette er i

overensstemmelse med en udtalelse af Pritchard (1992): "There have been several attempts at inoculation of oil contaminated soil, but with little success". Jobson et al. (1973) og Letomäki & Niemälä (1975) udførte feltforsøg med inokulering af olieforurenede jord. Letomäki & Niemälä (1975) så ingen effekt på olienedbrydningen ved inokulering af jorden med olienedbrydende bakterierenkulturer. Jobson et al. (1973) rapporterede kun ganske små virkninger ved at benytte inokulering; ligekædede alkaner blev nedbrudt lidt hurtigere, men denne effekt blev dog ikke set på alle parallelle plots.

I modsætning til dette viste Ellis et al. (1990) - i laboratorieforsøg - at inokulering af olieforurenede jord fra et olieraffinaderi havde en positiv virkning på nedbrydningen. Deres in-situ forsøg manglede uinokulerede kontroller, hvilket gør det vanskeligt at evaluere denne del af deres forsøg. På samme måde viste Portier et al. (1988), at der var nogle positive effekter - en kortere lagfase - ved at inokulere en jord forurenede med polyaromatiske kulbrinter med et kommercielt tilgængeligt inokulum sammenlignet med et inokulum af autochthon oprindelse.

Andre har undersøgt effekten på olienedbrydning af inokulering i et vandigt miljø. Atlas & Busdosh (1975) rapporterede nogle positive effekter: De undersøgte nedbrydning af råolie i et arktisk miljø og så, at nedbrydning i en saltholdig dam nær kysten blev fremmet af inokulering med *Pseudomonas* sp., mens den samme behandling ikke resulterede i højere nedbrydningsrate i en ferskvandsdam. Tagger et al. (1983) fandt, at der ikke var nogen positiv virkning af at inokulere et simuleret oliespild med store mængder af olienedbrydende bakterier; efter en måned var alle undtagen én af de tilsatte bakteriestammer forsvundet. Mueller et al. (1992) isolerede flere olienedbrydende bakteriestammer, som var i stand til at nedbryde olie i flydende kultur, men de havde ikke nogen yderligere virkning på olienedbrydningen sammenlignet med tilsætning af nærings-salte, når de blev tilsat et simuleret tidevandssystem.

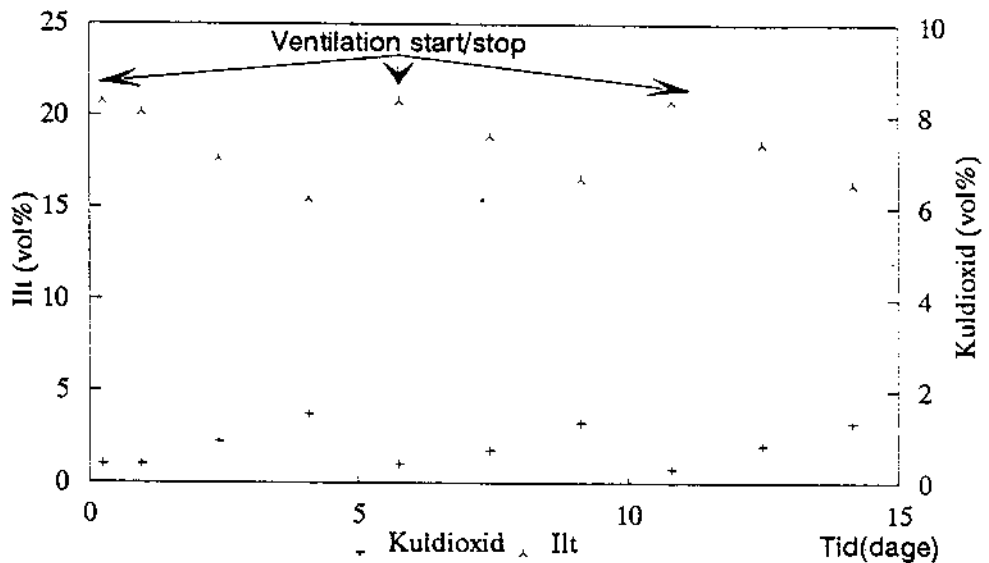
Den manglende succes med inokulering for at fremme biologisk nedbrydning forklares ofte med, at inokulum udsættes for konkurrence, prædation eller parasitisme af den indigene mikrobielle population (Vecchioli et al., 1990). For at modvirke disse effekter anbefales det nogle gange at benytte inokula op til 100 gange større end den indigene population, selvom dette synes at være et urealistisk højt tal i forbindelse med in-situ biologisk jordrensning. Af praktiske og økonomiske årsager blev der i containerforsøget benyttet et inokulum af samme størrelsesorden som den indigene population.

Den manglende virkning af inokulering, som var resultatet af containerforsøget, er således i god overensstemmelse med resultater opnået af andre i forudgående undersøgelser.

7.3 Biologisk nedbrydning vurderet ud fra resultaterne af respirationstestene

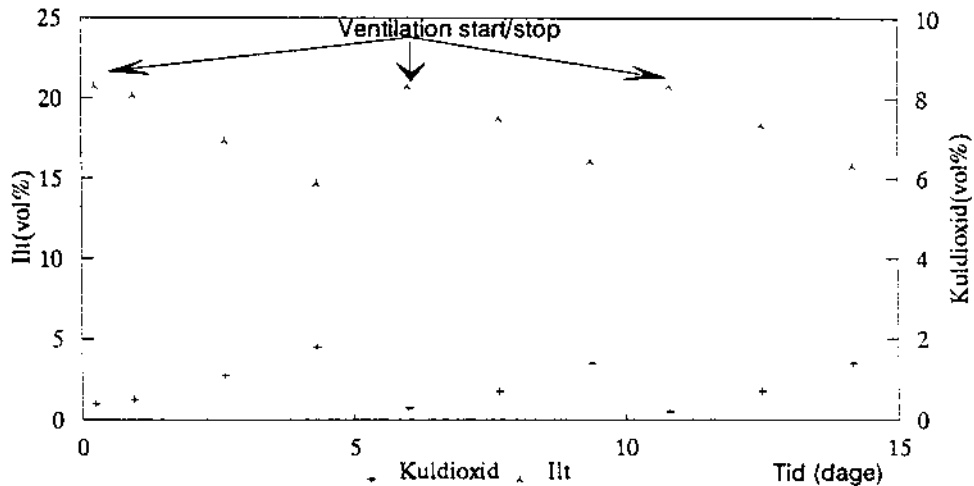
Som tidligere beskrevet blev respirationstestene udført med henblik på at vurdere nedbrydningshastigheden (se afsnit 4.4) på en nem og billig måde. Respirationstestene bestod i at afbryde bioventingen og løbende måle ilt- og kuldioxidindholdet i jordmatricen. Der blev udført 2 respirationstests i forsøgsperioden. Herudover blev iltoptagelsen i opstartsperioden benyttet til at vurdere den indledende nedbrydningshastighed. I appendiks 13 er den gennemsnitlige iltoptagelse og den gennemsnitlige kuldioxidproduktion for de 3 perioder beregnet.

Figur 7.3.1, 7.3.2 og 7.3.3 viser iltoptagelsen og kuldioxidproduktionen for 3 målepunkter i den første forsøgsperiode. Målepunkterne var placeret i hvert af de 3 rum i container II. På figurene er vist 3 perioder, hvor ventilationen var henholdsvis tændt og slukket (3 cykluser). Bioventingcyklusen er beskrevet i appendix 6.



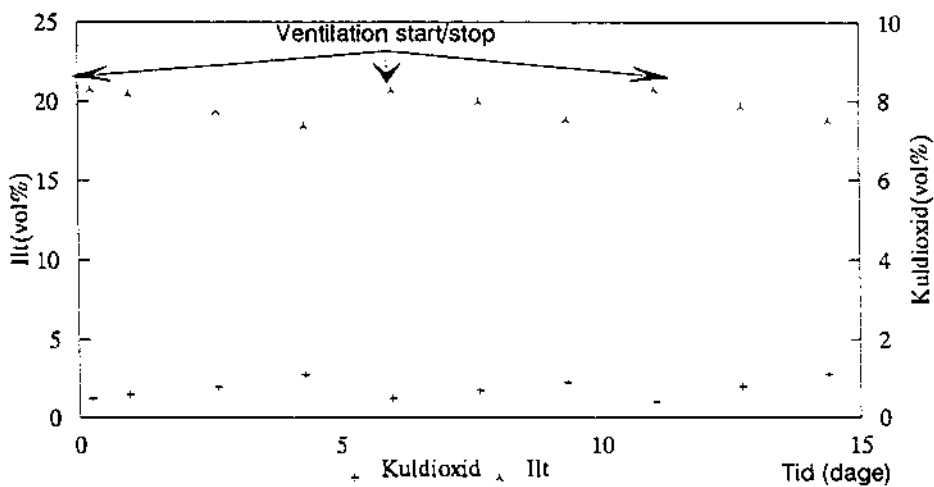
Figur 7.3.1

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i et tidsrum på 15 timer i juli, 7 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der blev beluftet og tilsat næringssalte og bakterier.



Figur 7.3.2

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i et tidsrum på 15 timer i juli, 7 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der blev beluftet og tilsat næringssalte.



Figur 7.3.3

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i et tidsrum på 15 timer i juli, 7 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der udelukkende blev beluftet.

I de perioder, hvor bioventing ikke blev foretaget (3 timer og 15 minutter), målte følgende gennemsnitlige iltoptagelseshastighed i de 3 rum:

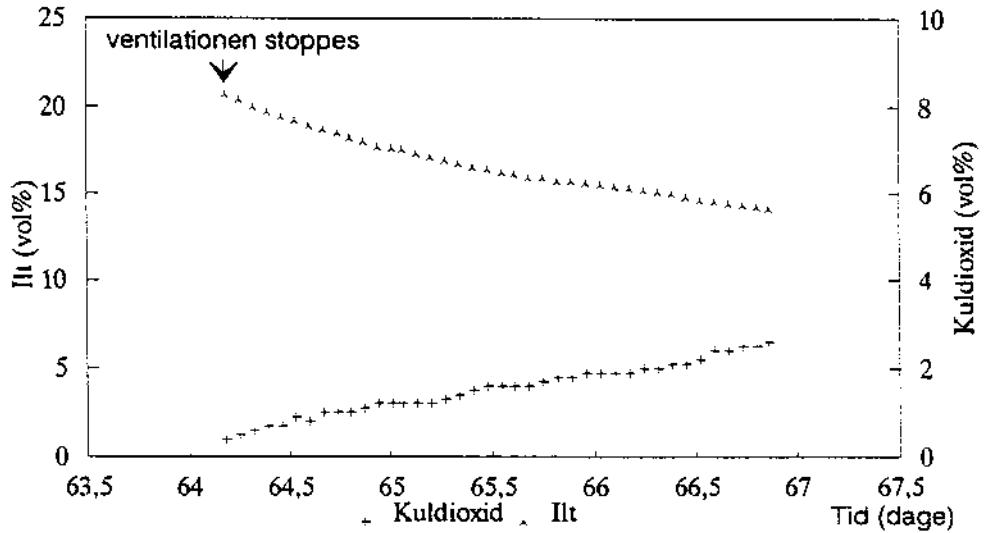
Tabel 7.3.1

Gennemsnitlig iltoptagelseshastighed og standardafvigelse, (N = 4) i de tre rum i container II i den første forsøgsperiode (juli).

Rum	Gennemsnitlig iltoptagelse ± standardafvigelse (vol %/dag)
Container II: Luft	9,7 ± 3,2
Container II: Luft, næringssalte	36,7 ± 17,6
Container II: Luft, næringssalte, bakterier	32 ± 6,6

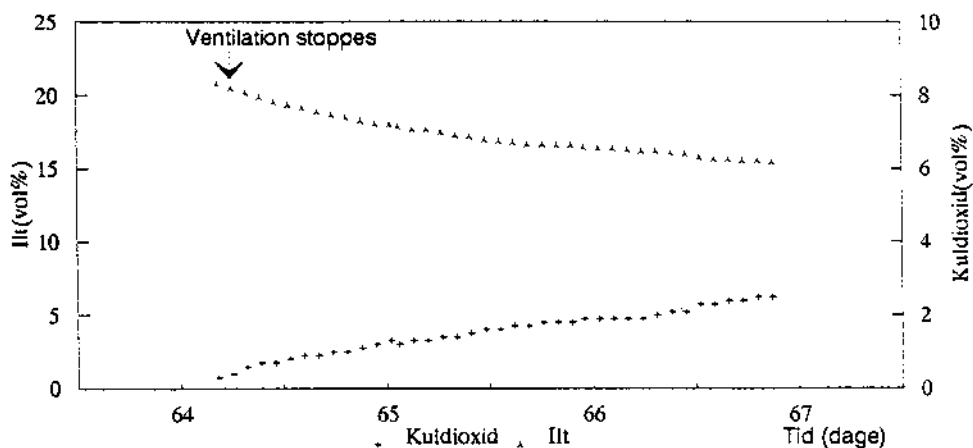
Af figurerne og af tabel 7.3.1 fremgår det tydeligt, at den første tilsætning af næringssalte havde en stimulerende effekt på iltoptagelseshastigheden. Samtidig syntes tilsætningen af bakterier ikke at have nogen stimulerende effekt.

Figur 7.3.4, 7.3.5 og 7.3.6 viser iltoptagelsen og kuldioxidproduktionen målt på 3 målepunkter i respirationstestene gennemført i september. Målepunkterne var placeret i hvert af de tre rum i container II.



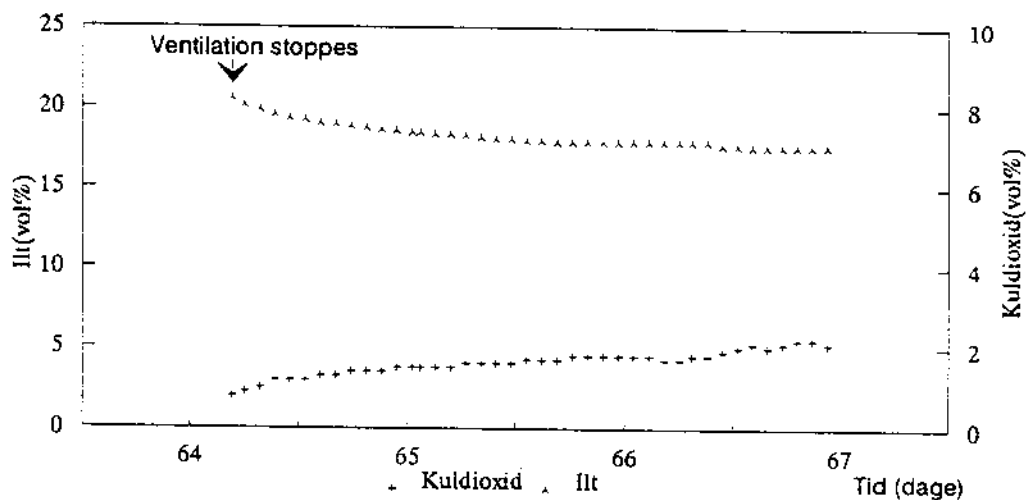
Figur 7.3.4

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i september, 64-67 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der blev beluftet og tilsat næringssalte og bakterier.



Figur 7.3.5

Iloptagelse og kuldioxidproduktion målt i september, 64-67 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der blev beluftet og tilsat næringssalte.



Figur 7.3.6

Iloptagelse og kuldioxidproduktion målt i september, 64-67 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der udelukkende blev beluftet.

I den periode, hvor der blev udført respirationstests (ca. 3 dage), målt følgende gennemsnitlige iltoptagelseshastighed i de 3 rum:

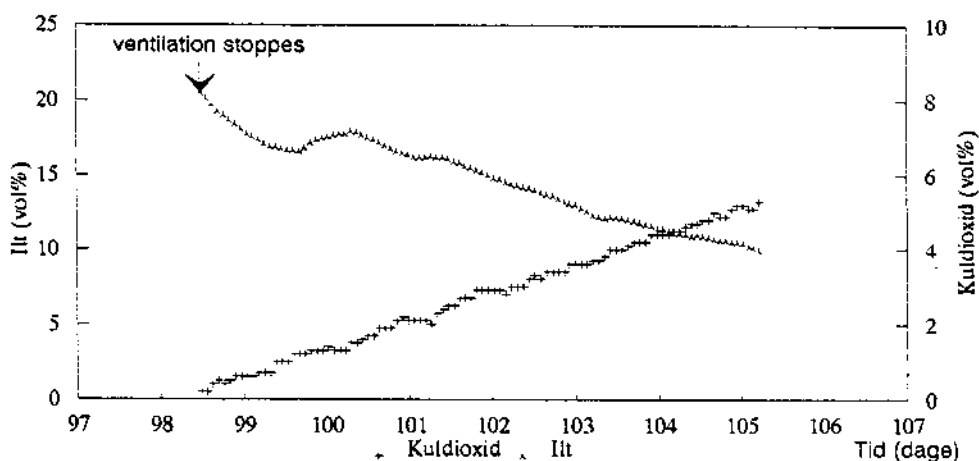
Tabel 7.3.2

Gennemsnitlig iltoptagelseshastighed og standardafvigelse (N = 4) i de 3 rum i container II, hvori der blev udført respirationstests i september.

Rum	Gennemsnitlig iltoptagelse ± standardafvigelse (vol %/dag)
Container II: Luft	1,0 ± 0,2
Container II: Luft, næringssalte	1,8 ± 0,7
Container II: Luft, næringssalte, bakterier	2,2 ± 0,3

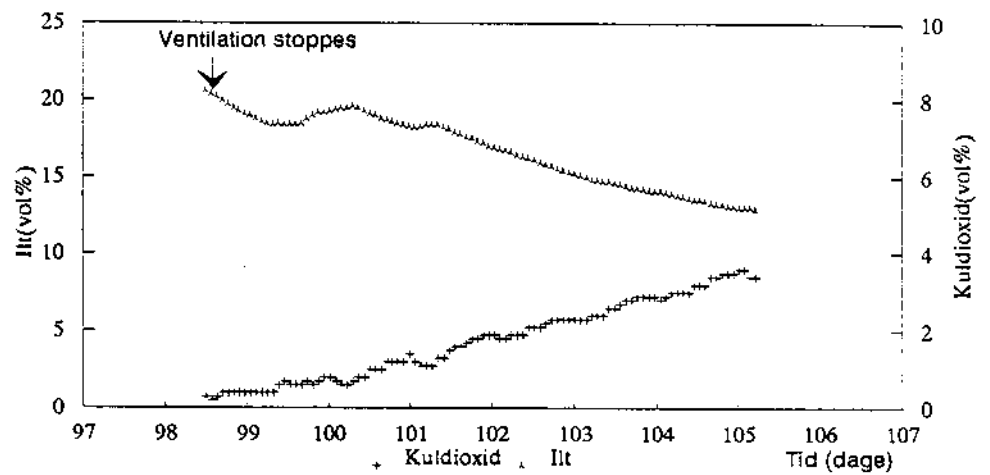
På basis af figurerne og tabel 7.3.2 fremgår det tydeligt, at iltoptagelseshastigheden er faldet betydeligt siden juli, og at den første tilsætning af næringssalte fortsat syntes at have en stimulerende virkning på iltoptagelsen. Samtidig havde tilsætningen af bakterier stadig kun meget lille eller ingen indvirkning på iltoptagelsen.

Endelig viser figur 7.3.7, 7.3.8 og 7.3.9 iltoptagelsen og kuldioxidproduktionen på 3 målepunkter i respirationstesten, der fandt sted i oktober. Målepunkterne var placeret i hvert af de 3 rum i container II.



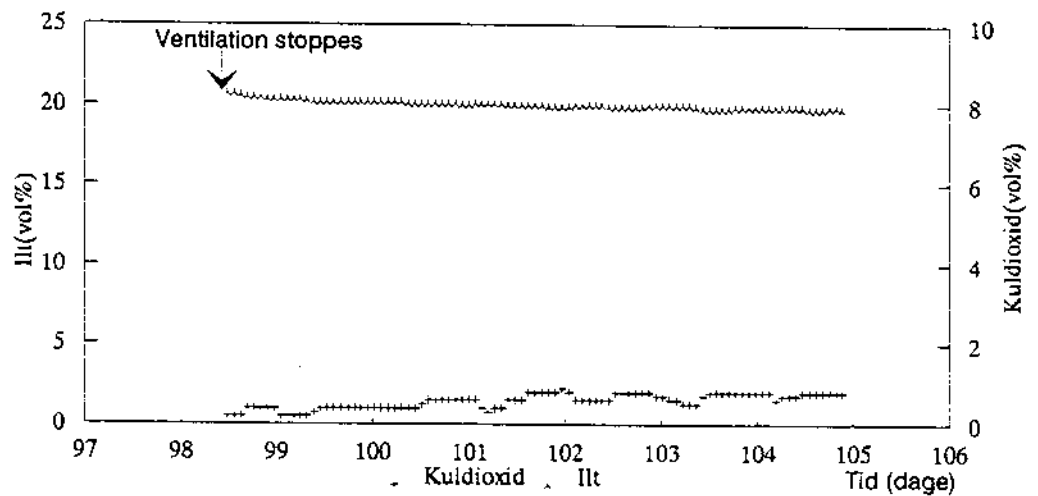
Figur 7.3.7

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i oktober, 98-106 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der blev beluftet og tilsat næringssalte og bakterier.



Figur 7.3.8

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i oktober, 98-106 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der blev beluftet og tilsat næringsalte.



Figur 7.3.9

Iltoptagelse og kuldioxidproduktion målt i oktober, 98-106 dage efter forsøgsstart. Målingerne blev foretaget i det rum i container II, der udelukkende blev beluftet.

I perioden, hvor der blev udført respirationstests (ca. 7 dage), målttes følgende gennemsnitlige iltoptagelseshastighed i de 3 rum:

Tabel 7.3.3

Gennemsnitlig iltoptagelseshastighed og standardafvigelse (N = 4) i de 3 rum i container II, hvori der blev udført respirationstests i oktober.

Rum	Gennemsnitlig iltoptagelse ± standardafvigelse (vol %/dag)
Container II: Luft	0,3 ± 0,3
Container II: Luft, næringssalte	0,9 ± 0,6
Container II: Luft, næringssalte, bakterier	1,1 ± 0,7

På baggrund af figurerne og tabel 7.3.3 fremgår det, at iltoptagelseshastigheden var lavere end ved den forrige respirationstest. I perioden mellem respirationstestene i september og oktober blev der tilsat en ny portion næringssalte. Dette havde imidlertid ingen effekt, idet iltoptagelseshastigheden var lavere end i september. Årsagen til faldet i iltoptagelsen kan være, at temperaturen faldt ca. 5-10°C i denne periode.

En vurdering af nedbrydningshastigheden for dieselolie vha. resultaterne fra respirationstestene findes i appendix 14: Vurderingen bygger på den antagelse, at kulbrinterne forefindes i formen CH₂₁₆ (se appendix 1). Nedbrydningshastigheder, som beregnes på basis af kuldioxidproduktionen, er lavere end hastighederne beregnet ud fra iltoptagelsen. Dette fænomen er observeret i tidligere undersøgelser, hvor man har forsøgt at beregne nedbrydningshastigheden vha. resultater fra respirationstests (Ong et al., 1991; Dupont & Doucette, 1991). Dette kan skyldes, at kuldioxid i modsætning til ilt er forholdsvis følsomt over for ændringer i pH-værdien og indholdet af vand i jorden. Af den grund er iltoptagelseshastigheden en bedre indikator for biologisk aktivitet (Dupont & Doucette, 1991).

Tabel 7.3.4

Nedbrydningshastighed for dieselolie ± standardafvigelse beregnet på basis af iltoptagelseshastighed.

Rum	Biologisk nedbrydning (juli) mg hydroc. pr dag pr kg jord	Biologisk nedbrydning (september) mg hydroc. pr dag pr kg jord	Biologisk nedbrydning (oktober) mg hydroc. pr dag pr kg jord
Container I: beluftning + N,P	35,5 ± 6,5	1,2 ± 0,1	0,19 ± 0,05
Container I: beluftning + N,P + bakterier	14 ± 11,5	1,3 ± 0,5	0,98 ± 0,49
Container II: beluftning	7,5 ± 2,5	0,8 ± 0,2	0,24 ± 0,27
Container II: beluftning + N,P	29 ± 14	1,5 ± 0,6	0,75 ± 0,50
Container II: beluftning + N,P + bakterier	25 ± 5	1,8 ± 0,3	0,93 ± 0,63

Tabel 7.3.4 viser nedbrydningshastigheden for dieselolie beregnet på basis af iltoptagelseshastigheden. Den højeste, gennemsnitlige nedbrydningshastighed på 35,5 ± 6,5 mg dieselolie/dag/kg jord blev opnået i container I i det beluftede rum, der blev tilsat næringsalte.

Tabel 7.3.5

Nedbrydningshastighed for dieselolie ± standardafvigelse beregnet på basis af kuldioxidproduktion.

Rum	Biologisk nedbrydning (juli) mg hydroc. pr dag pr kg jord	Biologisk nedbrydning (september) mg hydroc. pr dag pr kg jord	Biologisk nedbrydning (oktober) mg hydroc. pr dag pr kg jord
Container I: beluftning + N,P	20,9 ± 7,4	0,81 ± 0,1	0,19 ± 0,03
Container I: beluftning + N,P + bakterier	6,1 ± 3,7	0,63 ± 0,16	0,61 ± 0,29
Container II: beluftning	4,4 ± 1,0	0,49 ± 0,11	0,17 ± 0,17
Container II: beluftning + N,P	19,7 ± 13,8	0,86 ± 0,43	0,49 ± 0,33
Container II: beluftning + N,P + bakterier	10,5 ± 4,9	0,90 ± 0,10	0,62 ± 0,43

Tabel 7.3.5 viser nedbrydningshastigheden for kulbrinter beregnet på basis af kuldioxidproduktionen. Hastighederne beregnet i tabel 7.3.5 svarer til resultaterne i tabel 7.3.4, idet den højeste, gennemsnitlige nedbrydningshastighed, $20,9 \pm 7,4$ mg dieselolie/dag/kg jord, blev opnået i container I i det rum, der blev beluftet og modtog næringssalte.

De hastigheder, som er beregnet på basis af kuldioxidproduktionen, er imidlertid 40-50% lavere end hastighederne beregnet ud fra iltoptagelsen. Ser man bort fra de ovenfor beskrevne årsager kunne dette være blevet resultatet, hvis kun noget af ilten var brugt til mineralisering af dieselolien.

Ved udførelse af respirationstests på en grund forurenet med JP-4 brændstof fandt Ong et al. (1991) frem til en biologisk nedbrydningshastighed på $2,9 \pm 0,2$ mg hexan/kg jord/dag. Van Eyk & Vreeken (1989) fandt frem til en biologisk nedbrydningshastighed på 8 mg/kg/dag på en grund forurenet med dieselolie.

De nedbrydningshastigheder, der er opnået i dette projekt ved anvendelse af respirationstests, er derfor højere, men dog af samme størrelsesorden som hastigheder, der er konstateret i tidligere forsøg. Den højere hastighed i dette forsøg kan skyldes, at jordmatricen er mere ensartet end for in-situ forhold på en forurenet grund.

7.4 Sammenligning og vurdering af forsøgsresultaterne

Sammenlignes dataene fra respirationstestene (tabel 7.3.4) med dataene for dieseloliekoncentrationen i jorden (figur 7.2.1 og 7.2.2) fremgår det tydeligt, at de indledningsvist høje nedbrydningshastigheder, der holdt i ca. 30 dage, blev efterfulgt af forholdsvis lave nedbrydningshastigheder i resten af perioden. Faldet i nedbrydningshastigheden kan til dels være forårsaget af et fald i omgivelsestemperaturen, specielt i oktober og november. Temperaturfald har normalt en indvirkning på mineraliseringshastigheden. Swinianski et al. (1975) fandt, at kuldioxidproduktionen steg til det tredobbelte, når jordtemperaturen hævedes fra 15°C til 30°C . Ændringen i dieseloliens sammensætning har muligvis også haft indflydelse på nedbrydningshastigheden.

Udvaskning af dieselolie i forbindelse med tilsætning af bakterier og næringssalte og fordampning ved bioventingprocessen havde forsvindende lille betydning, hvilket indikerer, at dieselolien forsvinder pga. biologisk nedbrydning.

For at kunne foretage en kvantitativ sammenligning mellem de målte værdier for iltoptagelse og nedbrydning af dieselolie, blev nedbrydningshastigheden for dieselolie beregnet for de første 19 dage af forsøget. Mængderne af dieselolie, der blev nedbrudt i de forskellige containerrum i dette tidsrum, blev beregnet ud fra de i appendix 15 opgivne data ved at trække de gennemsnitlige koncentrationstværdier for dag 19 fra værdierne for dag 0. Det må understreges, at disse nedbrydningshastigheder kun er

gældende for de første 19 dage af forsøget, og at de ikke kan ekstrapoleres til resten af forsøgsperioden. Endvidere må det pointeres, at dataene skal tolkes med et vist forbehold på grund af den store variation.

I tabel 7.4.1 er den gennemsnitlige nedbrydningshastighed for dieselolie beregnet ved at tage gennemsnittet af resultaterne fra de modsvarende containerrum. Nedbrydningshastigheder beregnet på baggrund af nedbrydning af dieselolie var højere end hastigheder beregnet ud fra iltoptagelse. Hastighederne stemte dog overens, idet de højeste hastigheder blev opnået ved beluftning og tilsætning af næringssalte.

Tabel 7.4.1

Beregnete gennemsnitlige nedbrydningshastigheder for dieselolie i juli beregnet på basis af de modsvarende rum i container I og II.

Behandling	Hastighed beregnet ud fra iltoptagelse ⁽¹⁾ mg/kg jord/dag	Hastighed beregnet ud fra kuldioxidproduktion ⁽²⁾ mg/kg jord/dag	Hastighed beregnet ud fra nedbrydning af dieselolie ⁽³⁾ mg/kg jord/dag
Kontrol			8
Beluftning	8	4	27
Beluftning Næringssalte	32	20	74
Beluftning Næringssalte Bakterier	20	8	46

(1) Beregnet ud fra tabel 7.3.4

(2) Beregnet ud fra tabel 7.3.5

(3) Beregnet ud fra data i appendix 15

Resultaterne fra henholdsvis respirationstestene og målinger af dieseloliekoncentrationen viser, at tilsætning af næringssalte og udførelse af bioventing har en markant virkning på nedbrydningen af dieselolie sammenlignet med de tilfælde, hvor der ikke tilsættes næringssalte. Disse resultater stemmer overens med laboratorieforsøgene, der viste, at jorden var P og N begrænset. Eftersom målinger i kontrollen uden bioventing viste en betydelig iltkoncentration, var faldet i indholdet af dieselolie i dette rum forståeligt. Resultaterne viser dog, at tilsætning af næringssalte og bioventing har en betydelig effekt i sammenligning med kontrollen, idet der blev opnået en slutkoncentration for dieselolie på mellem 326-440 mg/kg jord i rummene med næringssalte og bioventing sammenlignet med rummene uden næringssalte, hvor der blev opnået en slutkoncentration på ca. 1.000 mg/kg jord.

Hverken respirationstestene eller målinger af dieseloliekoncentrationen viste, at tilsætningen af olienedbrydende bakterier havde nogen virkning. Dette stemmer overens med tidligere undersøgelser.

Som tidligere nævnt har både temperatur og ændringer i dieseloliens sammensætning stor betydning for nedbrydningshastigheden.

Tabel 7.4.2

Beregnete gennemsnitlige nedbrydningshastigheder kalkuleret på basis af respirationsdata (tabel 7.3.4) fra modsvarende rum i container I og II.

Rum	Nedbrydning mg/dag/kg jord i juli ¹	Nedbrydning mg/dag/kg jord i september ²	Nedbrydning mg/dag/kg jord i oktober ³
Beluftning	8	0,8	0,2
Beluftning + N, P	32	1,4	0,5
Beluftning + N, P + bakterier	20	1,6	1,0

¹ Omgivelsestemperatur 14°C

² Omgivelsestemperatur 10°C

³ Omgivelsestemperatur 2°C

Fra juli til september havde ændringen i dieseloliens sammensætning sandsynligvis stor betydning på den målte iltoptagelse. Temperaturfaldet fra september til oktober var betydeligt og medvirkede sandsynligvis til faldet i iltoptagelsen.

Temperaturen i september udgør i gennemsnit den normale jordtemperatur i Danmark fra 1 m under jordoverfladen.

Hastigheden målt på baggrund af iltoptagelsen i september blev brugt til at beregne, hvornår dieselolien ville være fuldstændig nedbrudt. For de beluftede rum i containerne, der blev tilsat næringssalte, blev det beregnet, at nedbrydningen af de resterende 400 mg dieselolie/kg jord til en koncentration på 50 mg dieselolie/kg jord ville tage ca. 260 dage. Hvis hastigheden målt på baggrund af iltoptagelsen i oktober anvendes til samme beregning, ville nedbrydningen tage ca. 2 år i de beluftede rum, der blev tilsat næringssalte.

Endelig viste forsøgsresultaterne en betydelig forskel mellem container I og II, til trods for at det blev tilstræbt at få en ensartet koncentration af dieselolie i jorden. Forskellen er et udtryk for de problemer, som kan forventes i forbindelse med biologisk jordrensning udført in-situ på grund af den uensartede fordeling af olie i jordmatricen og de deraf følgende problemer med dokumentation af en fuldstændig rensning.

8 Fremtidige aspekter

8.1 Økonomiske betragtninger og driftsteknik i forbindelse med bioventing

På baggrund af de resultater, der er opnået i dette projekt, skal muligheden for yderligere forbedringer undersøges.

Sayles et al. (1992) kombinerede bioventing med opvarmning af jorden til over omgivelsestemperaturen, hvorved nedbrydningshastigheden hele året forøgedes. Man foretog undersøgelser af et passivt og et aktivt opvarmningssystem på en grund forurenet med flybrændstof. Det passive system udnyttede solvarme, idet forsøgsområdet blev overdækket med plastik, og om vinteren blev varmen tilbageholdt ved at området isoleredes. Den aktive opvarmning blev opnået ved at lede varmt vand ned i jorden og derefter dække forsøgsområdet med isoleringsmateriale. Undersøgelsen er endnu ikke afsluttet, men anvendelse af det aktive opvarmningssystem har medført mere end en fordobling af nedbrydningshastigheden sammenlignet med en kontrol.

For at forbedre systemet vil det for tilsætningen af næringssalte blive overvejet, om det er rentabelt med en kontinuerlig tilsætning af vand indeholdende næringsstoffer.

Omkostningerne i forbindelse med bioventing varierer meget. I forbindelse med et feltforsøg er et groft skøn på \$50/t jord blevet nævnt (U.S. EPA Report, 1989). På en lokalitet, hvor sandet jord var forurenet med flybrændstof, blev omkostninger til bioventing angivet til ca. \$20/m³ jord (Vogel, 1991).

Etableringsomkostningerne er først og fremmest afhængige af, hvorvidt der skal anlægges vandrette eller lodrette injektions/vakuumboringer. Hvis man anlægger vandrette boringer, vil etableringsomkostningerne beløbe sig til 65-75% af de samlede omkostninger i modsætning til 20-35% for lodrette boringer (Nielsen, 1993). Hvis den udsugede luft skal behandles med aktivt kul, vil udgifterne til denne behandling typisk udgøre en betydelig del af driftsomkostningerne det første år. Som følge deraf vil driftsomkostningerne det første år for bioventing på en benzinforurenet grund overstige omkostningerne til bioventing på en grund forurenet med dieselolie.

Tidsforbruget til en fuldstændig oprensning er hovedsagelig afhængigt af koncentrationen af forurenende stoffer, forureningstype, hydrogeologi og omgivelsestemperaturen. Omkostningerne til oprensningen afhænger af den forbrugte tid, selv om etableringsomkostningerne vil udgøre hovedparten af udgifterne, idet driftsomkostningerne er relativt lave. Driftsomkostningerne vil hovedsagelig omfatte elektricitet, næringssalte, vedligeholdelse

holdelse og kontrolaktiviteter. Driftsomkostninger vil herudover afhænge af mængden af forurenede jord, idet en større mængde vil betyde lavere driftsomkostninger pr. ton jord.

Antallet af boringer for injektion og udsugning af luft har ligeledes stor betydning for etableringsomkostningerne. Den mest rentable fordeling af boringer skal vurderes på en aktuell forurenede grund ved at udføre bioventing in-situ.

8.2 Berigelseskultur til nedbrydning af UCM

Det er blevet forsøgt at udvikle en alternativ strategi - sekventiel berigelse - til isolering af bakteriekulturer, som kan nedbryde UCM-delen af dieselolie. Sekventiel berigelse består i at opsplitte berigelserne i flere afdelinger, hvor den ikke-nedbrudte oliedel og mulige nedbrydningsprodukter fra den foregående berigelse udgør substratet i den følgende berigelse. I princippet kan denne procedure gentages så mange gange som nødvendigt for at få olien fuldstændigt nedbrudt. De enkelte trin i berigelsen leder til isolering af renkulturer, som kan dyrkes hver for sig i fermentorer og derefter blandes til et veldefineret inokulum.

Forsøg med denne teknik er blevet udført på Afdeling for Generel Mikrobiologi siden sommeren 1993; de foreløbige resultater er lovende, men det er endnu ikke lykkedes at isolere renkulturer i anden-generations berigelserne.

De positive resultater af containerforsøget, som viste at bioventing og tilsætning af næringssalte fremmede nedbrydningen af dieselolie vil - i forbindelse med isolering af UCM-nedbrydende renkulturer - kunne udnyttes i projektfase 2. Rækkefølgen af jordbehandlinger i fase 2 vil derfor blive forskellig fra pilotfasen, hvor olienedbrydende bakterier blev tilsat i begyndelsen af forsøgsperioden. I fase 2 kunne man begynde med at tilsætte næringssalte og igangsætte bioventingen til udelukkende UCM-delen af olien var tilbage (1-2 måneder), hvorefter man kunne tilsætte en UCM-nedbrydende renkultur.

8.3 Fase 2 - opskalering til in-situ forhold

I fase 2 vil bioventing-teknikken blive anvendt til biologisk rensning af en forurenede grund. Grunden vil blive opdelt i 4 områder med forskellige afstande mellem injektions- og vakuumboringerne og 1 område til kontrol. Ud over en opskalering til naturlige forhold vil driftsteknikken blive optimeret i fase 2.

Der vil blive foretaget sammenligning mellem forskellige bioventing-cykluser og bioventingflows. Herudover vil det blive vurderet, hvor mange injektions- og vakuumboringer, der skal etableres pr. jordvolumen.

Forskellige strategier for tilsætning af næringssalte vil ligeledes blive undersøgt. En svag næringssaltopløsning brugt i forbindelse med kontinuerlig vanding kan være en løsning på problemerne med nitratudvaskning.

Afhængig af grundvandsbetingelserne på stedet kan det være nødvendigt at sænke grundvandsniveauet. Dette aspekt skal overvejes i forbindelse med bioventing, såfremt denne teknik skal anvendes generelt til biologisk jordrensning af forurenede grunde.

Bortset fra bioventingen udført in-situ på en forurenede grund omfatter fase 2 en laboratorieundersøgelse. Som beskrevet i afsnit 8.2 vil muligheden blive undersøgt for at isolere kulturer, som er i stand til at nedbryde de svært nedbrydelige dieseloliekomponenter, som findes i UCM. Forhåbentlig vil det være muligt at teste kulturerne in-situ i fase 2 ved at tilsætte en bakteriel opløsning til den forurenede grund.

Et yderligere problem i forbindelse med alle teknikker inden for in-situ behandling er dokumentationen af oprensningen. Ved biologisk jordrensning in-situ vha. bioventing er det muligt at benytte iltoptagelsen som en indikator for den biologiske nedbrydning. Målinger af iltoptagelsen er betydeligt billigere end at analysere for kulbrinter i jordprøverne. Omkostningerne til analyser kan derfor nedsættes betragteligt ved at begrænse jordprøvetagningen til begyndelsen og slutningen af oprensningsperioden, og således i stedet benytte måling af iltoptagelsen som en indikator for nedbrydningen. En procedure for dokumentation skal fastlægges ud fra de erfaringer, der opnås i fase 2.

9 Konklusion

Af containerforsøgets fase 1 - biologisk jordrensning under simulerede in-situ betingelser - kan udledes følgende konklusioner:

- Dieselolien forsvandt på grund af den biologiske nedbrydning.
- Bioventing med en luftstrøm svarende til 0,36 porevolumen/time var tilstrækkeligt til at sikre beluftningen af jordmatricen.
- Tilsætningen af næringssalte og udførelse af bioventing havde en positiv effekt på den biologiske nedbrydning i sammenligning med en kontrol.
- Tilsætningen af olienedbrydende bakterier havde ingen synlig effekt på den biologiske nedbrydning.
- En gennemsnitlig nedbrydningshastighed for dieselolie på 74 mg/kg jord/dag blev beregnet i juli for et beluftet containerrum, hvortil næringssalte var tilsat.
- På baggrund af respirationsdataene for juli for et beluftet containerrum, der fik tilsat næringssalte, blev der beregnet en gennemsnitlig nedbrydningshastighed for dieselolie på 32 mg/kg jord/dag.
- Ændringer i sammensætningen af dieselolien og temperaturfald medførte en betydelig reduktion i nedbrydningshastigheden for dieselolie.
- Respirationstests kan benyttes som delvis dokumentation for oprensning af en forurenede grund, når bioventing benyttes til oprensning in-situ. Dette medfører en reduktion i antallet af jordprøver, der skal analyseres for olie.
- Systemerne til brug for tilsætning af næringssalte og beluftning af jordmatricen virkede tilfredsstillende og kan efter optimering benyttes til biologisk jordrensning udført in-situ.

Referencer

- Aggarwal, P. K.; J.L. Means, R.E. Hinchee. 1991.** Formulation of nutrient solutions for in situ bioremediation. In *In Situ Bioreclamation Application & Investigation for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Hinchee, R.E. & Robert F. Olfenbuttel (eds.). Columbus, Ohio, pp. 52-66.
- Atlas, R. M. 1991.** Bioremediation of Fossil Fuel Contaminated Soils. In: "In Situ Bioreclamation. Application and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation. Edited by R. E. Hinchee & R.F.Olfenbuttel. Butterworth-Heinemann. USA. pp. 14-32.
- Atlas, R. M. 1977.** Stimulated petroleum biodegradation. *Crit. Rev. Rev. Microbiol.* 5, 371-386.
- Atlas, R. M., & M. Busdosh. 1975.** Microbial Degradation of Petroleum in the Arctic. In *J. M. Sharply (ed.), Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*.
- Bewley, Richard, J. F. 1992.** Key technical issues raised in recent case studies of bioremediation. *International Symposium, Soil decontamination using biological processes, Karlsruhe/D, pp. 866-871.*
- Bossert, I., W. M. Kachel, & R. Bartha. 1984.** Fate of Hydrocarbons During Oil Sludge Disposal in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:763-767.
- Brown, R.A.; R.D. Norris. 1993.** The evolution of a technology: Hydrogen peroxide in in situ bioremediation. *Paper in preparation.*
- Brown, E. J., & J. F. Braddock. 1990.** Sheen Screen, a Miniaturized Most-Probable-Number Method for Enumeration of Oil-Degrading Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3895-3896.
- Dibble, J. T., & R. Bartha. 1979.** Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:729-739.
- Dott, W., D. Fiedieker, P. Kämpfer, H. Schleibinger, & S. Strechel. 1989.** Comparison of Autochthonous Bacteria and Commercially Available Cultures with Respect to Their Effectiveness in Fuel Oil Degradation. *Journal of Industrial Microbiology* 4:365-374.

- Dupont, R. Ryan; William J. Doucette. 1991.** Assessment of in situ bioremediation potential and the application of bioventing at a fuel-contaminated site. In *Situ Bioreclamation Application & Investigation for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. In *Hinchee, R.E. & Robert F. Olfenbuttel (eds.)*. Columbus, Ohio, pp. 262-282.
- Elliott, E. T., R. V. Anderson, D. C. Coleman, and C. V. Cole. 1980.** Habitable pore space and microbial trophic interactions. *Oikos*. 35:327-335.
- Ellis, B., M. T. Balba & P. Thiele. 1990.** Bioremediation of oil contaminated land. *Environmental Technology*, vol. 11, p. 443-455.
- Ellis, B., P. Harold & H. Kronberg. 1991.** Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environmental Technology*, vol. 12, p. 447-459.
- Elsas, J.D. van, J. T. Trevors & L. S. van Overbeek. 1991.** Influence of soil properties on the vertical movement of genetically-marked *Pseudomonas* fluorescence through large soil microcosm. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 10, p. 249-255.
- Eyk, J. van; C. Vreeken. 1989.** Venting-mediated removal of diesel oil from subsurface soilstrata as a result of stimulated evaporation and enhanced biodegradation. In *Hazardous Waste and Contaminated Sites, Envirotech Vienna, vol 2., Session 3, ISBN 389432-009-5. Westarp Wiss, Essen, 1989, pp. 475-485.*
- Fontes, D. E., A. L. Mills, G. M. Hornberger & J. S. Herman. 1991.** Physical and Chemical Factors Influencing Transport of Microorganisms through Porous Media. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 9, p. 2473-2481.
- Gannon, J., Y. T. Tan, P. Baveye & M. Alexander. 1991b.** Effect of Sodium Chloride on Transport of Bacteria in a Saturated Aquifer Material. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 9, p. 2497-2501.
- Gannon, J. T., V. B. Manilal & M. Alexander. 1991a.** Relationship between Cell Surface Properties and Transport of Bacteria through Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 1, p. 190-193.
- Goldstein, R. M., L. M. Mallory & M. Alexander. 1985.** Reasons for Possible Failure of Inoculation to Enhance Biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, (4), p. 977-983.
- Gordon, A. S., & F. J. Millero. 1984.** Electrolyte Effects on Attachment of an Estuarine Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 47, no. 3, p. 495-499.

Gough, M. A., & S. R. Rowland. 1990. Characterization of Unresolved Complex Mixtures of Hydrocarbons in Petroleum. *Nature* 344:648-650.

Griffin, Christoffer J.; John M. Armstrong. 1992. Bioventing of a gasoline spill at Traverse City, Michigan: Practical engineering considerations. *Bioremediation of hazardous wastes by Biosystems Technology Development Program*, pp. 65-66.

Gruijz, Katalin (1992): In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. *International Symposium, Soil decontamination using biological processes, Karlsruhe/D*, pp. 779-787.

Gudehus, G.; J.Swinianski; H. Würdemann. 1993. Biological in situ-remediation of sandy gravelly gasworks subsoils. In *Contaminated Soil 93*, F. Arendt, G. J. Annokée, R. Bosman and W. J. van den Brink (eds.), pp. 1047-1056. *Kluwer Academic Publ. Printed in Netherlands*.

Guerin, W. F., & S. A. Boyd. 1992. Differential Bioavailability of Soil-Sorbed Naphthalene to Two Bacterial Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1142-1152.

Hamer, G. & A. Heitzer. 1991. Polluted Heterogenous Environments: Macro-scale Fluxes, Micro-scale Mechanisms and Molecular Scale Control. In: *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*, p. 233-249, Edited by G.S.Sayer, R. Fox & J.W. Blackburn, Plenum Press, New York.

Harder, H.; Th. Höpner. 1991. Hydrocarbon biodegradation in sediments and soils. *Science & Technology*, vol. 44, no. 9, pp. 329-332.

Harvey, R. W., L. H. George, R. L. Smidt & D.R. LeBlanc. 1989. Transport of Microspheres and Indigenous Bacteria through a Sandy Aquifer: Results of Natural- and Forced-Gradient Tracer Experiments. *Environmental Science and Technology*, 23, p. 51-56.

Hedegaard, H. M. 1985. Fælles Arbejdsmetoder for Jordbundsanalyser, *Published by the Ministry of Agriculture, Copenhagen*.

Heitkamp, M. A., W. Franklin, & C. E. Cerniglia. 1988. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2549-2555.

Hoeppe, R. E., R. E. Hinchey & M. F. Arthur. 1991. Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology*, no. 8, p. 141-146.

Huysman, F. & W. Verstrate. 1993a. Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 25, no. 1, p. 83-90.

- Huysman, F. & W. Verstrate. 1993b.** Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: influence of inoculation and irrigation methods. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 25, no. 1, p. 90-97.
- Jang, L.-K., P. W. Chang, J. E. Findley & T. F. Yen. 1983.** Selection of Bacteria with Favourable Transport Properties Through porous Rock for the Application of Microbial-Enhanced Oil Recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 46, no. 5, p. 1066-1072.
- Jenneman, G. E., M. J. McInerney & R. M. Knap. 1985.** Microbial penetration through Nutrient- Saturated Berea Sandstone. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 50, no. 2, p. 383-391.
- Jobson, A., M. McLaughlin, F. D. Cook, & D. W. S. Westlake. 1974.** Effect of Amendments on the Microbial Utilization of Oil Applied to Soil. *Applied Microbiology* 27:166-171.
- Kampbell, Don H.; John T. Wilson; Christopher J. Griffin. 1992.** Performance of bioventing at Traverse City, Michigan. *Bioremediation of hazardous wastes by Biosystems Technology Development Program*, pp. 61-64.
- Keck, J., R. C. Sims, M. Coover, K. Park, & B. Symons. 1989.** Evidence for Cooxidation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Wat. Res.* 23:1467-1476.
- Kiohara, H., K. Nagao, & K. Yana. 1982.** Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:454-457.
- Leahy, J. G. & R. R. Colwell. 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54(3): 305-315.
- Letomäki, M., & S. Niemelä. 1975.** Improving Microbial Degradation of Oil in Soil. *Ambio* 4:126-129.
- Lindhardt, B., & J. Jacobsen. 1991.** Nedbrydning af dieselolie i umættet jord: Laboratorieundersøgelser. *Lossepladsprojektet, rapport A2.*
- Lindstrom, J. E., R. C. Prince, J. C. Clark, M. J. Grossman, T. R. Yeager, J. F. Braddock, & E. J. Brown. 1991.** Microbial Populations and Hydrocarbon Biodegradation Potentials in Fertilized Shoreline Sediments Affected by the T/V Exxon Valdez Oil Spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2514-2522.
- Lund, N. Christian. 1990.** Biological in-situ remediation of contaminated soil polluted by hydrocarbons. ATV møde, In-situ and on-site remediation of contaminated soil and groundwater.

- Lund, N.-Ch.; H. Würdemann; J. Swinianski; G. Gudehus. 1991.)** Experiences from a field test for a biological in situ remediation of contaminated gasworks subsoils. BIOMEC/COMETT-conference: Soil and Groundwater Cleaning, Nov. 1991, Hindsgavl Castle, Denmark.
- Macleod, F. A., H. M. Lappin-Scott & J. W. Costerton 1988.** Plugging of a Model Rock System by Using Starved Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 6, p. 1365-1372.
- Marlow, H. J., K. L. Duston, M. R. Wiesner, M. B. Tomson, J. T. Wilson & C. H. Ward. 1991.** Microbial transport through porous media: The effects of hydraulic conductivity and injection velocity. *Journal of Hazardous Materials*, 28, p. 65-74.
- McDowell-Boyer, L., J. Hurt & N. Sitar 1986.** Particle Transport Through Porous Media. *Water Resources Research* vol 22, no. 13, p. 1901-1921.
- Morgen, P., R. J. Watkinson. 1992.** Factors Limiting the Supply and Efficiency of Nutrient and Oxygen Supplements for the *in situ* Biotreatment of Contaminated Soil and Ground Water. *Wat. Res.* vol. 26, no. 1, pp. 73-78.
- Mueller, J. G., S. M. Resnick, M. E. Shelton, & P. H. Pritchard. 1992.** Effect of Inoculation on the Biodegradation of Weathered Prudhoe Bay Crude Oil. *Journal of Industrial Microbiology* 10:95-102.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattmann, & P. H. Pritchard. 1990.** Isolation and Characterization of a Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1079-1086.
- Nielsen, M. 1993.** Oprensning af benzin- og olieforurening in situ teknik. ATV-møde, Jordrensning. SAS, Scandinavia Hotel, København den 26. maj 1993, side 75-85.
- Oberbremer, A. & R. Müller-Hurtig. 1989.** Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 582-586.
- Ong, Say Kee; Robert Hincee; Ron Hoeppe; Rick Scholze. 1991.** In situ respirometry for determining aerobic degradation rates. In: In Situ Bioreclamation Application & Investigation for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation. *Hincee, R.E. & Robert F. Olfenbuttel (eds.). Columbus, Ohio, pp. 541-545.*

Portier, R., M. Bianchini, K. Fujisaki, C. Henry, & D. McMillin. 1988. Comparison of Effective Toxicant Biotransformation by Autochthonous Microorganisms and Commercially Available Cultures in the In Situ Reclamation of Abandoned Industrial Sites. In *Z. Filip (ed.), Biotechnologische In-situ-Sanierungen Kontaminierter Standorte. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.*

Powell, R.M.; R.W. Callaway; J.T. Michalowski; S.A. Vandegrift, M.V. White; D.H. Kampbell; B.E. Bledsoe and J.T. Wilson. 1988. Comparison of methods to determine oxygen demand for bioremediation of a fuel contaminated aquifer. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry, vol. 34, pp. 253-263.*

Pritchard, P. H. 1992. Use of Inoculation in Bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology 3:232-243.*

Rusansky, S., R. Avigad, S. Michael, & D. Gutnick. 1987. Involvement of a Plasmid in Growth on and Dispersion of Crude Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* RA57. *Appl. Environ. Microbiol. 53:1918-1923.*

Sayles, Gregory D.; Richard C. Brenner; Robert E. Hincbee; Catherine M. Vogel; Ross N. Miller. 1992. Optimizing bioventing in shallow vadose zones and cold climates: Eielson AFB bioremediation of a JP-4 spill. *Bioremediation of hazardous wastes by Biosystems Technology Development Program, pp. 31-35.*

Sayles, Gregory D.; Richard C. Brenner; Robert E. Hincbee; Catherine M. Vogel; Ross N. Miller. 1992. Optimizing bioventing in deep vadose zones and moderate climates: Hill AFB bioremediation of a JP-4 spill. *Bioremediation of hazardous wastes by Biosystems Technology Development Program, pp. 37-39.*

Sims, J. L., Sims, R. C., & J. E. Matthews. 1990. Approach to Bioremediation of Contaminated Soil. *Hazard Waste Hazard Mater. 7:117-148.*

Smith, M. S., G. W. Thomas, E. R. White & D. Ritonga. 1985. Transport of *Escherichia coli* Through Intact and Disturbed Soil Columns. *Journal of Environmental Quality, vol. 14, no. 1, p. 87-91.*

Song, H., X. Wang, & R. Bartha. 1990. Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills. *Appl. Environ. Microbiol. 56:652-656.*

Song, H., & R. Bartha. 1990. Effects of Jet Fuel Spills on the Microbial Community of Soil. *Appl. Environ. Microbiol. 56:646-651.*

Swinianski, J.; N.-Ch. Lund; H. Würdemann, G. Gudehus. 1991. Laboratory tests for a biological in situ remediation of contaminated gasworks soils. BIOMECC/COMETT-conference: Soil and Groundwater Cleaning, Nov. 1991, Hindsøglav Castle, Denmark.

- Tagger, S., A. Bianchi, M. Julliard, J. Le Petit, & B. Roux. 1983.** Effect of Microbial Seeding of Crude Oil in a Model System. *Marine Biology* 78:13-20.
- Trevors J. T. & J. D. Van Elsas, L. S. Van Overbeek & M. E. Starodub. 1990.** Transport of a genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* strains through a soil microcosm. *Applied and Environmental Microbiology* 56, p. 401-408.
- Van Veen, J. A., and E. A. Paul. 1981.** Organic carbon dynamics in grassland soils. 1. Background information and computer simulations. *Can. J. Soil. Sci.* 61: 185-201.
- Vecchioli, G. I., M. T. Del Panno, & M. T Paineira. 1990.** Use of Autochthonous Soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil. *Environmental Pollution* 67:249-258.
- Venkateswaran, K., T. Iwabuchi, Y. Masui, H. Toki, E. Hamada, & H. Tanaka. 1991.** Distribution and Biodegradation Potential of Oil-degrading Bacteria in North Eastern Japanese Coastal Waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86:113-122.
- Venosa, A. D., J. R. Haines, W. Nisamanepong, R. Govind, S. Pradhan, & B. Siddique. 1992.** Efficacy of Commercial Products in Enhancing Oil Biodegradation in Closed Laboratory Reactors. *Journal of Industrial Microbiology* 10:13-23.
- Venosa, D. V., J. R. Haines, & D. M. Allen. 1992.** Efficacy of Commercial Inocula in Enhancing Biodegradation of Weathered Crude Oil Contaminating a Prince William Sound Beach. *Journal of Industrial Microbiology* 10:1-11.
- Walker, J. D., & R. R. Colwell. 1976.** Enumeration of Petroleum-Degrading Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:198-207.
- Wilson E.M. (1990):** Engineering hydrology. Macmillan Education LTD. Fourth edition. London pp. 87.
- Yates, M. V. & S. R. Yates. 1988.** Modelling microbial fate in the surface environment. *Critical reviews in environmental control*, vol. 17, no. 4, p. 307-344.

Appendikser

Appendiks 1

Overslag på iltforbrug ved fuldstændig nedbrydning til CO₂ og H₂O

Appendiks 2

Brintperoxid stabilitetstest

Appendiks 3

Fremgangsmåde i forbindelse med brintperoxid stabilitetstests

Appendiks 4

Analysemetode til bestemmelse af brintperoxid

Appendiks 5

Analyse af partikelstørrelsen i den til forsøget anvendte jord

Appendiks 6

Resultat fra måling af luftemissionerne

Appendiks 7

Målepunkter i forsøgscontainerne

Appendiks 8

Vand til containerforsøg

Appendiks 9

Jordsøjleforsøg

Appendiks 10

Fremgangsmåde ved tilsætning af bakterier

Appendiks 11

Prøvetagningsplan for containerforsøget

Appendiks 12

Analysemetode

Appendiks 13

Respirationstest

Appendiks 14

Hastighed for biologisk nedbrydning beregnet på baggrund af resultater af respirationstestene udført in-situ

Appendiks 15

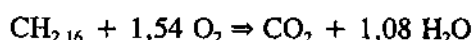
Dieseloliekoncentration i jordprøver

Appendiks 1**Overlag på iltforbrug ved fuldstændig nedbrydning til CO₂ og H₂O**

Jorden har et gennemsnitligt indhold af totalkulbrinter på 5.000 mg/kg jord.

Huling & Bledsoe (1991) og Powell et al. (1988) angiver, at kulbrinterne (flybrændstof) kan antages at være på formen CH_{2,16}, hvilket medfører en molvægt på 14,16.

Reaktion ved nedbrydning:



mol kulbrinter = 5.000/14,16 = 353 mmol, til nedbrydning af disse kræves 1,54 x 353 = 544 mmol ilt, hvilket svarer til 544 x 32 = 17.401 mg ilt pr. kg jord.

Iltforbrug pr. g kulbrinter: 17401 mg ilt/5.000 mg kulbrinter = 3,48 g ilt/g olie.

Ved et iltforbrug, der er 50% større end det støkiometriske forudsagte, fås et forbrug på 26 g ilt/kg jord.

Iltning af jordmatricen med vand indeholdende brintperoxid

Scott & Bert (1991) angiver:

Tilgængelig ilt = opløst ilt + 0,471 x koncentrationen af brintperoxid

$$C_{\text{opløst ilt}} = 10,65 \text{ mg/l (ved } 10^\circ\text{C, Teoretisk Vandhygiejne)}$$

$$C_{\text{brintperoxid}} = 300 \text{ mg/l:}$$

$$C_{\text{tilgængelig ilt}} = 10,65 + 0,471 \times 300 \text{ mg/l} = 152 \text{ mg/l}$$

$$\text{Påkrævet vandmængde: } 26/0,15 = 173 \text{ l vand/kg jord.}$$

For en container gælder:

$$V_{\text{jord}} = 5 \text{ m} \times 2,3 \text{ m} \times (2,15 - 0,4) \text{ m} = 20 \text{ m}^3$$

$$\delta_{\text{jord}} = 1,67 \text{ ton/m}^3 \text{ (via laboratorieforsøg)}$$

$$M_{\text{jord}} = 20 \times 1,67 = 33,4 \text{ t jord}$$

Ved en forsøgsperiode på 5 måneder og kontinuert flow:

$$(173 \text{ l/kg jord} \times 33.400 \text{ kg jord}) / (5 \times 30 \times 24 \text{ h}) = 1,6 \text{ m}^3 \text{ vand/h} = 38,4 \text{ m}^3/\text{dag}$$

Laboratorieundersøgelser har vist, at ved løs pakning af jorden i containerne fås en permeabilitets-koefficient $K = 9,8^{-05}$ m/sek. Denne permeabilitetskoefficient er tilstrækkelig stor til, at det ønskede flow kan opnås.

Iltning af jordmatrixen med luft

Atmosfærisk luft: massefylde = 1,293 g/l (1 atm, 0°C) (indeholder ca. 20% ilt)

Ilt: massefylde = 1,429 g/l (1 atm, 0°C)

Den krævede iltmængde var på 26 g ilt/kg jord, dvs.

$$26 \times 1,670 = 43.420 \text{ g ilt/m}^3 \text{ jord}$$

Ved forsøgsperiode på 5 måneder og kontinuert flow kræves:

$$43.420 / (5 \times 30 \times 24) = 12,1 \text{ g ilt/m}^3 \text{ jord x h}$$

$$12,1 / (1,293 \times 0,2) = 46,6 \text{ l atm luft/m}^3 \text{ jord x h}$$

$$12,1 / (1,429) = 8,5 \text{ l ilt/m}^3 \text{ jord x h}$$

For to containere gælder:

$$\text{Atm luft: } 46,6 \times 40 = 1.864 \text{ l/h}$$

$$\text{Ilt: } 8,5 \times 40 = 340 \text{ l/h}$$

Med et porevolumen på 30% fås 560 l luft/m³ jord

Luftudskiftning

$$\text{Atm luft: } 46,6 / 560 = 0,08 \text{ gange pr. time}$$

$$\text{Ilt: } 8,5 / 560 = 0,02 \text{ gange pr. time}$$

Linhardt & Andersen (1991) har i deres forsøg benyttet en luftudskiftning på 10 gange i timen og finder, at kun 1% af kulbrinterne fjernes med luftstrømmen. Hvis det ønskede luftflow kan opnås i jordmatrixen er både ilt og atmosfærisk luft en mulighed som oxidationsmiddel.

Appendiks 2

Brintperoxid-stabilitetstests

Det søges klarlagt, hvorvidt brintperoxid er et egnet oxidationsmiddel ved nedbrydningen af diesel-oilen i jord fra Statoil depotet i Hedehusene. Et muligt problem ved at benytte brintperoxid er stof-fets ringe stabilitet i vandige opløsninger.

Lokalitetsspecifikke forskelle har stor betydning for stabiliteten af brintperoxid, idet jordbakteriernes catalaseaktivitet, pH og indholdet af Fe, Mn og tungmetaller alle er vigtige faktorer. Derfor vælges det at udføre indledende laboratorieforsøg med den aktuelle jord. Jordens indhold af tungmetaller blev undersøgt, og koncentrationen viste sig at være uden betydning.

Formålet med laboratorieforsøget er, at undersøge brintperoxids stabilitet ved en startkoncentration på 100 mg/l. Ved dekomponering af brintperoxiden svarer en koncentration på 100 mg/l til en iltkoncentration på ca. 47 mg/l, hvilket igen svarer til mætningskoncentrationen for ilt i vand (i ligevægt med ren ilt). Ved brintperoxidkoncentrationer over denne værdi opstår risiko for dannelse af luftbobler og en deraf følgende nedsat porøsitet i jordmatricen. I tidligere undersøgelser er der benyttet brintperoxidkoncentrationer fra 15 til 5.000 mg/l. Brintperoxid har dog vist sig at være toksisk overfor bakterier i høje koncentrationer. I forsøg med en startkoncentration på 50 mg/l brintperoxid og derefter langsom tilvending til en koncentration på 200 mg/l er der ikke registreret toksisk effekt på bakterierne (Huling & Bledsoe, 1991). I containerforsøget vil det derfor blive aktuelt at benytte brintperoxidkoncentrationer begyndende på 50 mg/l og derefter langsomt øget til 200-300 mg/l.

Det vil blive undersøgt, hvorvidt der er mulighed for at øge stabiliteten af brintperoxid ved tilsætning af forskellige stoffer, som i tidligere forsøg har vist sig at være effektive. Da det er projektets overordnede mål at udvikle en metode til in-situ oprensning af en forurening, er det kun stoffer, som ikke i sig selv medfører en ny forurening, der vil blive testet. Da der kun ønskes en sammenligning af stabiliteten og ikke et estimat af den aktuelle nedbrydningshastighed for brintperoxid i jordmatricen, udføres forsøgene på en opslæmning af jord og demineraliseret vand. Derved elimineres problemer med at opnå ens opblanding af jorden med de forskellige tilsætningsstoffer og brintperoxiden.

Følgende stoffer har tidligere vist sig at øge brintperoxids stabilitet, dog i varierende grad:

Ortofosfat, Na_3PO_4 (jorden behandlede med 800 mg/l i 16 timer, Spain et al., 1989) (1.640 mg/l, Aggerwal et al., 1991), (2000 mg/l, Lawes, 1991)).

Trinatrium trimetafosfat, $\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$ (300 mg/l, Aggerwal et al., 1991).

Kaliumtripolyfosfat, $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (2.000 mg/l, Lawes, 1991)

Citronsyre, $\text{C}_6\text{O}_7\text{H}_8$ (100-200 mg/l, Aggerwal et al., 1991)

Eddikesyre, CH_3COOH

Trimetafosfat og citronsyre i en blanding (Aggerwal et al., 1991)

Mulige problemer: Ca medfører udfældning af CaPO_4 .

I første omgang vælges det at undersøge stofferne enkeltvis i de tidligere benyttede koncentrationsniveauer. Herved søges det klarlagt, om stofferne overhovedet har en virkning på brintperoxidstabiliteten i den benyttede jord. For at få en indikation af stoffernes effektivitet ved forskellige koncentrationer udføres stabilitetstest for tre forskellige koncentrationsniveauer for hvert stof. Der udføres dobbeltbestemmelse af hvert niveau. Der udføres ikke stabilitetstests for eddikesyre og citronsyre, idet disse stoffer i sig selv medfører et iltforbrug.

Forsøgsperioden blev fastlagt ved at indkøre metoden på en opslæmning uden tilsætning af stabiliserende stoffer, og pH i opslæmningen målt. Indledningsvis målt efter 1/2, 1 og 2 timer og efter længere tid i de tilfælde, hvor nedbrydningen skete langsomt. En beskrivelse af fremgangsmåden findes i appendiks 3.

Forsøgsresultater

Temperatur: 19-23°C

pH (start): 6,01-6,88

Forsøgsperiode: 31.03.93-07.04.93

Omrøring: Konstant i alle forsøg

Farvereagens for analysen: Der blev fremstillet én reagens hver dag. Variationen i standardkurven fra morgen til aften var maks. 5,7%.

Det blev undersøgt, om halveringstiden ($t_{1/2}$) for brintperoxid var afhængig af stabilisationsmidlet og den anvendte koncentration.

Forbindelse	Na_3PO_4	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$
Dosis	$t_{1/2}$ (minutter)	$t_{1/2}$ (minutter)	$t_{1/2}$ (minutter)
-	31,6	31,6	31,6
-	39,85	39,85	39,85
Lav	41,7	49,9	57,8
Lav	52,5	52,4	43,5
Mellem	55,5	50,2	49,8
Mellem	51,1	54,9	38,8
Høj	50,9	54,1	57,7
Høj	44,8	60,6	62

Variationnanalyser viste (med 99,9% sikkerhed), at doseringsniveauet havde en virkning på stabilisationen af brintperoxid, men forsøgene kunne ikke påvise nogen forskel mellem de tre kemiske forbindelser.

I sammenligning med litteraturen fremgik det, at aktiviteten i jorden lå i mellemkategorien, idet halveringstiden for brintperoxid i jord med lav aktivitet er ca. 6 timer og i jord med høj aktivitet ca. 15 minutter (Lawes, 1991). På baggrund af forsøgsresultaterne blev det konkluderet, at brintperoxiden sandsynligvis ville blive nedbrudt ved en hastighed, der lå over hastigheden for bakterieforbrug.

En hydraulisk undersøgelse af jorden viste en hydraulisk ledeevne på 3×10^{-5} m/sek. ved middel-pakning af jorden, som svarer til det, der blev anvendt i containerforsøgene. Beregninger i appendiks viser, at for at opnå en tilstrækkelig mængde ilt til nedbrydningen krævedes et vandflow på 38,4 m³/døgn pr. container. Ved fuld mætning af jorden i containeren med vand og med den faktiske hydrauliske ledeevne, viser beregningerne, at der kun kunne opnås et vandflow på 29 m³/døgn pr. container. Det var derfor sandsynligvis ikke muligt at opnå den ønskede flowhastighed under de givne betingelser.

Som følge af dette forsøg blev brintperoxid valgt fra som muligt iltmiddel.

Appendiks 3

Fremgangsmåde i forbindelse med brintperoxid-stabilitetstests

Udtagning af jord: 4 forskellige steder i hver container blev der med jordspyd udtaget en prøve. Prøverne samledes i en spand, således at der i alt blev udtaget ca. 2 kg (ca. 1,5 l). Jorden homogeniseredes og sten fjernedes.

I bægerglas afvejedes 30 g jord, hvortil der tilsattes 225 g væske. Herved opnåedes et l/s forhold på 7,5, og resultaterne kunne derved forsøges sammenlignet med tidligere forsøg (Lawes, 1991). I de 225 g væske var stabiliseringsstofferne opløst. Opløsningen stod under omrøring 1/2 time, inden brintperoxiden blev tilsat (20 ml med koncentration på 1.500 mg/l). Opslæmningerne stod under omrøring, idet omrøringen dog blev stoppet 2 min. inden prøveudtagning fra væskefasen. Prøven blev fortyndet i målekolbe (1 ml i 100 ml målekolbe), og delprøve blev udtaget og centrifugeret. Endelig blev der udtaget 15 ml fra supernatanten, tilsat 10 ml farvereagensopløsning og afslutningsvis målt på spektrofotometeret ved 505 nm (se appendiks 4 angående metode til analyse for brintperoxid).

Idet pH og temperatur har indflydelse på dekomponeringshastigheden, stabiliseredes alle opløsninger før forsøgsstart til pH 6-7 med svovlsyre, og forsøgstemperaturen blev fastholdt på samme niveau under forsøget.

Laboratoriet råder over 3 magnetomrørere: 3 stoffer x 3 konc. x 2 gentagelser + 3 blinde = 21, dvs. 7 runder.

Det blev forsøgt at stabilisere brintperoxidniveauet med tre fosfatsalte ved følgende koncentrationsniveauer:

Ortofosfat (Na_3PO_4): 500, 1.000, 2.000 mg/l

Natriumtripolyfosfat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$): 500, 1.000, 2.000 mg/l

Trimetafosfat ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$): 150, 300, 500 mg/l

Sammenligningen af evnen til at stabilisere brintperoxid blev foretaget ved at sammenligne halveringstiden for brintperoxiden i en tosidet variationsanalyse. Koncentrationsniveauet blev markeret på følgende måde:

(-)	ingen tilsætning
(lav)	tilsætning af stoffer ved den laveste koncentration
(medium)	tilsætning af stoffer ved middelkoncentration
(høj)	tilsætning af stoffer ved den højeste koncentration

Appendiks 4

Analysemetode til bestemmelse af brintperoxid

I laboratorieforsøgene til fastlæggelse af brintperoxids stabilitet var der behov for fastlæggelse af brintperoxidkoncentrationen i et interval fra 0 til 100 mg/l ($\approx 3000\mu\text{mol/l}$). Under hensyntagen til at enzymatiske analysemetoder generelt er mere specifikke over for enkeltstoffer, valgtes det at analysere for brintperoxid spektrofotometrisk via peberrods-peroxidase. Weppen et al. (1992) benytter denne analysemetode i brintperoxidtests, hvor der måles på opløsninger af jord og vand med en brintperoxidkoncentration på 10 g/l. Reaktionen er følgende :



4-aminoantipyrin og phenol valgtes som donorsubstrater (Frew et al., 1983). Det valgte substrat kunne anvendes direkte, hvorved arbejdskrævende oprensninger kunne undgås. Ved reaktionen dannedes et farvet produkt, som målttes ved 505 nm.

Analysemetoden indkørtes ved at benytte opskriften i Frew et al. (1992), med den forskel at der blev anvendt større reagenskoncentrationer i blandingen, idet de målte brintperoxid i et koncentrationsniveau fra 0 til 20 $\mu\text{mol/l}$.

FREMGANGSMÅDE

Følgende procedure blev brugt:

Fremstilling af farvereagens

I 1.000 ml målekolbe blev følgende tilsat:

- 2,34 g phenol
- 1,00 g 4-aminoantipyrin (Sigma-2814)
- 10 ml 0,1 M fosfat buffer pH=6,9
- 25 μM brintperoxid = 2,5 μmol brintperoxid = 85 μg brintperoxid.

Først lavedes en fortynding af 30% opløsningen. Derefter blev 5 ml udtaget i en 1.000 ml målekolbe og fortyndet til strengen (dette svarede til en 0,15% opløsning (1,5 g/l)). Fra denne fortynding blev 5 ml udtaget, som overføres til 1.000 ml målekolbe (dette svarer til en 0,00075% opløsning (7,5 mg/l)). Herfra blev 11 ml udtaget og overført til en 1.000 ml målekolbe.

- 0,2 μM peberrods-peroxidase, dvs. 0,02 μmol peroxidase, idet molvægten opgives til ca. 40.000 g/mol, svarer dette til at afveje 800 μg peberrods-peroxidase. 0,0008 g afvejedes og overførtes til en 1.000 ml målekolbe.

Opløsningen opbevarede i køleskab, når den ikke blev brugt. Da opløsningens holdbarhed ikke kendtes, måtte der hver dag køres standardrække flere gange.

Standardopløsninger

I det følgende omtales opløsningen med 7,5 mg brintperoxid/l som stamopløsningen.

1,125 mg brintperoxid/l ($33 \mu\text{mol/l}$), udtag 7,5 ml fra stamopløsning og fortynd i 50 ml målekolbe.

0,9 mg brintperoxid/l ($26,5 \mu\text{mol/l}$), udtag 6 ml fra stamopløsning og fortynd i 50 ml målekolbe.

0,675 mg brintperoxid/l ($19,9 \mu\text{mol/l}$), udtag 4,5 ml fra stamopløsning og fortynd i 50 ml målekolbe.

0,45 mg brintperoxid/l ($13,2 \mu\text{mol/l}$), udtag 3 ml fra stamopløsning og fortynd i 50 ml målekolbe.

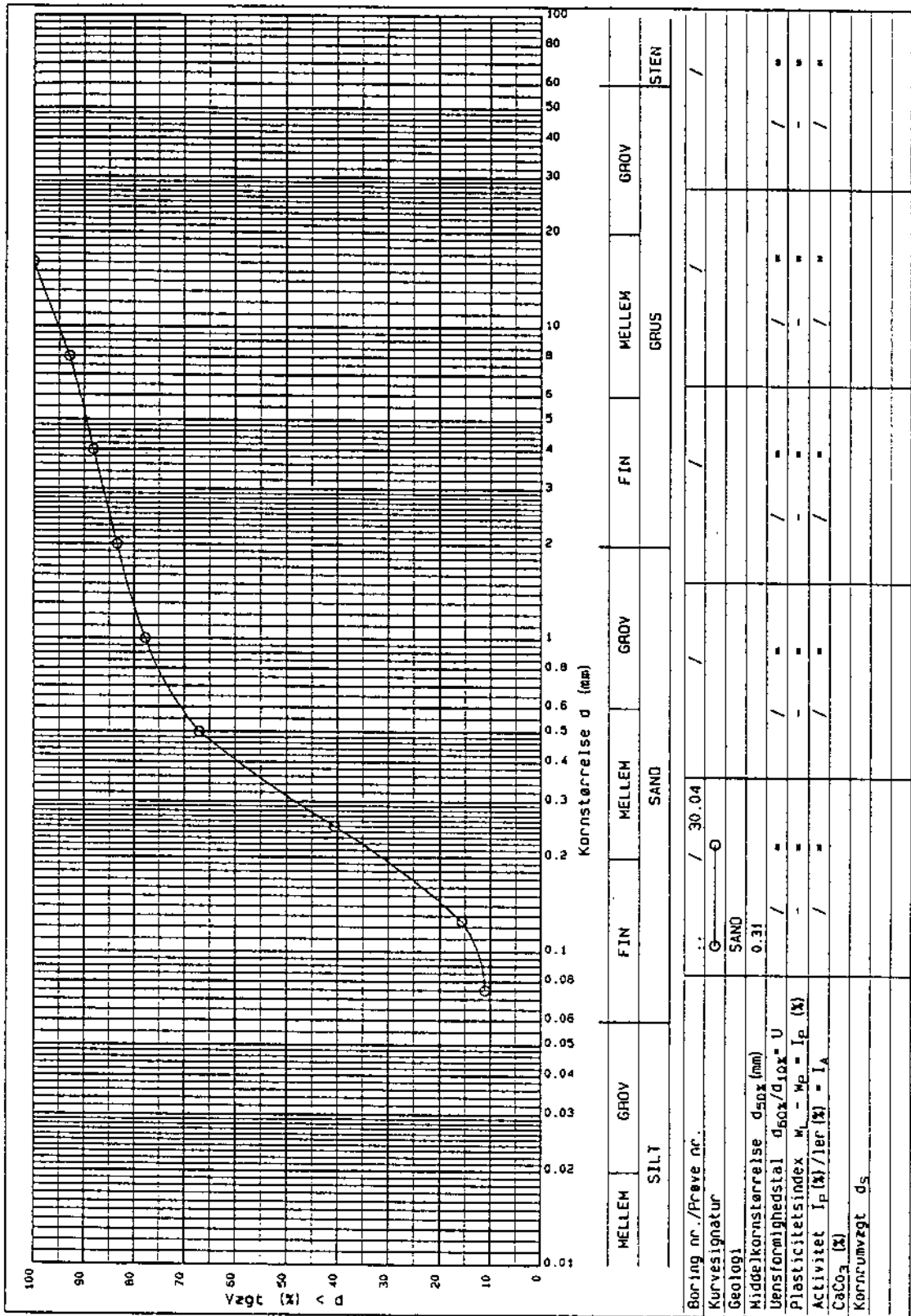
0,225 mg brintperoxid/l ($6,6 \mu\text{mol/l}$), udtag 1,5 ml fra stamopløsning og fortynd i 50 ml målekolbe.

0,0 mg brintperoxid/l

Procedure ved måling

10 ml farvereagens blev opblandet med 15 ml prøve. Denne blandings absorbans blev bestemt.

Appendiks 5
Analyse af partikelstørrelsen i den til forsøget anvendte jord



KORNKURVE		Dansk Geoteknik as			
Forsøg : JH	Dato: 930504	Sag : 190.203.02	SØRUP		
Kontrol : LHJ	Dato: 930505	Bilag nr.: 2.1		S. 1/1	
Godkendt : <i>J. J. J.</i>	Dato:				

Appendiks 6

Resultat fra måling af luftemissioner

1. Baggrund

Ballerup Kommune udstedte den 3. maj 1993 miljøgodkendelse i henhold til miljøbeskyttelseslovens kapitel 5 af Carl Bro as' in-situ-forsøgsanlæg beliggende Sørup Losseplads i Ballerup Kommune. Af godkendelsens vilkår 11 fremgår grænseværdier for massestrømme og emissionskoncentrationer.

Dette appendiks indeholder resultater fra måling af emissionerne i luftafkastet.

2. Luftstrøm i forsøgsanlægget

Der blev foretaget periodevis luftning i de to forsøgscontainere. Hver luftningsperiode var på 45 minutter og efterfulgtes af en 3,25 times pause uden luftgennemstrømning.

Der blev udtaget 3 stikprøver. Alle tre stikprøver blev udtaget, mens der var luftgennemstrømning i anlægget.

3. Omstændigheder ved prøvetagning af afkastluft

Generelt: Telthøjde = 5 m, skorstensmundingens højde over jorden = 6 m, skorstenens indre diameter = 40,8 mm (tværsnitsareal = 0,00131 m²).

1. stikprøve

Eksponeret: 11:08 til 11:53 19.07.93
Tryk: 1095,6 mbar
Temperatur: 23°C
Lufthastighed: 22 m/s

2. stikprøve

Eksponeret: 10:00 til 10:45 20.07.93
Tryk: 1086,5 mbar
Temperatur: 22°C
Lufthastighed: 19 m/s

3. stikprøve

Eksponeret: 15:00 til 15:45 20.07.93
Tryk: 1089,7 mbar
Temperatur: 23°C
Lufthastighed: 19 m/s

4. Beregning af massestrøm og emissionskoncentrationer

Vedlagt ses resultaterne fra kulrørsanalyserne.

Stofkoncentration i afkastluft

$$\text{Luftmængde} = 2 \text{ l/min.} \times 45 \text{ min.} = 90 \text{ l}$$

1. stikprøve

$$\text{Luftmængde} = (90 \text{ l} \times 1.095,6 \text{ mbar} \times 273^\circ\text{K}) / (1.000 \text{ l/m}^3 \times 1.013 \text{ mbar} \times 296^\circ\text{K}) = 0,0898 \text{ Nm}^3$$

$$\text{Toluenkoncentration} = (24/1.000 \text{ mg/rør}) / 0,0898 \text{ Nm}^3 = 0,267 \text{ mg/Nm}^3$$

$$\text{Koncentration af øvrige opgjort som xylener} = (36.000/1.000 \text{ mg/rør}) / 0,0898 \text{ Nm}^3 = 401 \text{ mg/Nm}^3$$

2. stikprøve

$$\text{Luftmængde} = (90 \text{ l} \times 1.086,5 \text{ mbar} \times 273^\circ\text{K}) / (1.000 \text{ l/m}^3 \times 1.013 \text{ mbar} \times 295^\circ\text{K}) = 0,0893 \text{ Nm}^3$$

$$\text{Toluenkoncentration} = (15/1.000 \text{ mg/rør}) / 0,0890 \text{ Nm}^3 = 0,169 \text{ mg/Nm}^3$$

$$\text{Koncentration af øvrige opgjort som xylener} = (46.000/1.000 \text{ mg/rør}) / 0,0893 \text{ Nm}^3 = 517 \text{ mg/Nm}^3$$

3. stikprøve

$$\text{Luftmængde} = (90 \text{ l} \times 1.089,7 \text{ mbar} \times 273^\circ\text{K}) / (1.000 \text{ l/m}^3 \times 1.013 \text{ mbar} \times 296^\circ\text{K}) = 0,0890 \text{ Nm}^3$$

$$\text{Toluenkoncentration} = (9/1.000 \text{ mg/rør}) / 0,0890 \text{ Nm}^3 = 0,101 \text{ mg/Nm}^3$$

$$\text{Koncentration af øvrige opgjort som xylener} = (45.000/1.000 \text{ mg/rør}) / 0,0890 \text{ Nm}^3 = 504 \text{ mg/Nm}^3$$

$$\text{Gennemsnitskoncentration, toluen} = 0,179 \text{ mg/Nm}^3$$

$$\text{Gennemsnitskoncentration, øvrige} = 474 \text{ mg/Nm}^3$$

Massestrøm i afkast

1. stikprøve

$$\text{Flow} = 0,00131 \text{ m}^2 \times 22 \text{ m/s} \times 3.600 \text{ s/h} = 103,8 \text{ m}^3/\text{h}$$

$$\text{Flow} = (103,8 \text{ m}^3/\text{h} \times 1.095,6 \text{ mbar} \times 273^\circ\text{K}) / (1.013 \text{ mbar} \times 296^\circ\text{K}) = 103,5 \text{ Nm}^3/\text{h}$$

$$\text{Massestrøm af toluen} = 0,267 \text{ mg/Nm}^3 \times 103,5 \text{ Nm}^3/\text{h} = 27,6 \text{ mg/h}$$

$$\text{Massestrøm af øvrige opgjort som xylener} = 401 \text{ mg/Nm}^3 \times 103,5 \text{ Nm}^3/\text{h} = 41.503,5 \text{ mg/h}$$

2. stikprøve

$$\text{Flow} = 0,00131 \text{ m}^2 \times 19 \text{ m/s} \times 3.600 \text{ s/h} = 89,6 \text{ m}^3/\text{h}$$

$$\text{Flow} = (89,6 \text{ m}^3/\text{h} \times 1.086,5 \text{ mbar} \times 273^\circ\text{K}) / (1.013 \text{ mbar} \times 295^\circ\text{K}) = 88,9 \text{ Nm}^3/\text{h}$$

$$\text{Massestrøm af toluen} = 0,169 \text{ mg/Nm}^3 \times 88,9 \text{ Nm}^3/\text{h} = 15,0 \text{ mg/h}$$

$$\text{Massestrøm af øvrige opgjort som xylener} = 517 \text{ mg/Nm}^3 \times 88,9 \text{ Nm}^3/\text{h} = 45.961,3 \text{ mg/h}$$

3. stikprøve

$$\text{Flow} = 0,00131 \text{ m}^2 \times 19 \text{ m/s} \times 3.600 \text{ s/h} = 89,6 \text{ m}^3/\text{h}$$

$$\text{Flow} = (89,6 \text{ m}^3/\text{h} \times 1.089,7 \text{ mbar} \times 273^\circ\text{K}) / (1.013 \text{ mbar} \times 296^\circ\text{K}) = 88,9 \text{ Nm}^3/\text{h}$$

$$\text{Massestrøm af toluen} = 0,101 \text{ mg/Nm}^3 \times 88,9 \text{ Nm}^3/\text{h} = 9,0 \text{ mg/h}$$

$$\text{Massestrøm af øvrige opgjort som xylener} = 504 \text{ mg/Nm}^3 \times 88,9 \text{ Nm}^3/\text{h} = 44.805,6 \text{ mg/h}$$

$$\text{Gennemsnitsmassestrøm, toluen: } 17,2 \text{ mg/h} = 0,179 \text{ mg/m}^3$$

$$\text{Gennemsnitsmassestrøm, øvrige: } 45.063 \text{ mg/h} = 474 \text{ mg/m}^3$$

$$\text{Spidsværdi, toluen: } 27,6 \text{ mg/h} = 0,008 \text{ mg/sek}$$

$$\text{Spidsværdi, øvrige: } 45.961 \text{ mg/h} = 12,8 \text{ mg/sek}$$

5. Luftningscyklus

Den 14.07.93 kl. 12:00 til den 28.07.93 kl. 09:00:

Kl. 04:00 til kl. 04:45 : Bioventing tilsluttet

Kl. 08:45 til kl. 09:30 : Bioventing tilsluttet

Kl. 01:30 til kl. 02:15 : Bioventing tilsluttet

Kl. 06:15 til kl. 07:00 : Bioventing tilsluttet

Kl. 11:00 til kl. 11:45 : Bioventing tilsluttet

Total bioventing = 3.150 min. = 52,5 timer

Den 28.07.93 kl. 09:00:

Kl. 00:00 til kl. 00:45 : Bioventing tilsluttet

Kl. 04:00 til kl. 04:45 : Bioventing tilsluttet

Kl. 08:00 til kl. 08:45 : Bioventing tilsluttet

Kl. 12:00 til kl. 12:45 : Bioventing tilsluttet

Kl. 04:00 til kl. 04:45 : Bioventing tilsluttet

Kl. 08:00 til kl. 08:45 : Bioventing tilsluttet

Total bioventing den 28.07.93 kl. 09:00 til den 28.10.93 kl. 04:00 = 20.610 min. = 343,5 timer.

6. Maksimal emission af dieselolie med ventingluft

Når bioventingen var tilsluttet, ledte ventilatorerne 20 m³ luft/h.

Emission fra den 14.07.93 kl. 12.00 til den 28.10.93 kl. 04.00 = 20 m³/h x 396 h = 7.920 m³ delt på 5 containerrum.

500 x 7.920 = 3.960 g kulbrinter ⇒ 792 g kulbrinter pr. containerrum.

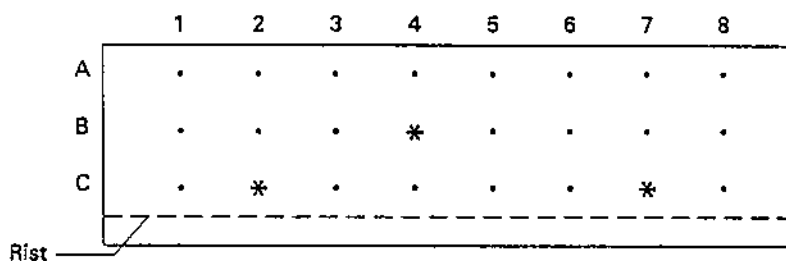
% fald i kulbrintekonzentration, som kan skyldes fordampning:

$792 \times 100 / 20.400\% = 4\%$

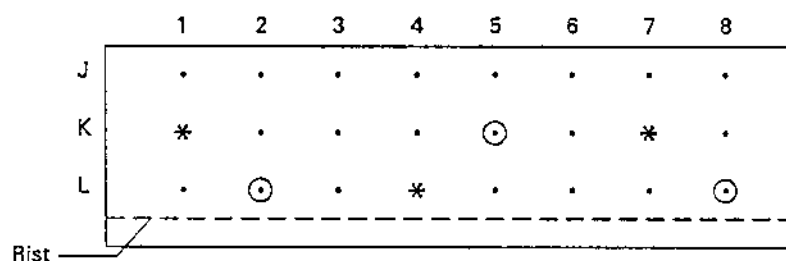
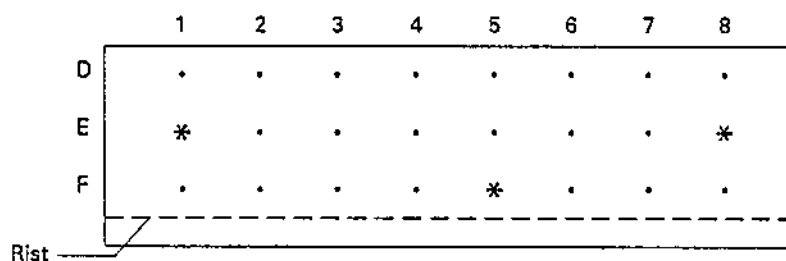
Den 28.10.93 blev dieseloliekoncentrationen målt til 0,67 mg/Nm³, og derfor kunne bioventingen fra den 28.10.93 til den 01.01.94 kun medføre fordampning af ca. 3 mg kulbrinter fordelt på de 5 containerrum.

4% fald i dieseloliekoncentrationen var derfor den maksimale værdi, der kunne skyldes fordampning.

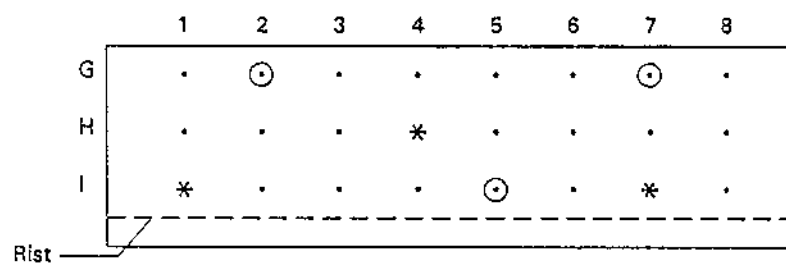
Appendiks 7
Målepunkter i forsøgscontainerne



Container I



Container II



SIGNATUR:

- : Målepunkt, 1½" + 1" hul
- ⊙ : Målepunkt til O₂ og CO₂
- * : Målepunkt til O₂, CO₂ og temperatur

Appendiks 8

Vand til containerforsøg

Første tilsætning af næringssalte

Den 8.-9. juli 1993 blev der tilsat en vandig suspension indeholdende næringssalte. Der ønskedes et C:N:P forhold på 120:10:1. Jorden indeholdt i gennemsnit 2.500 mg totalkulbrinter/kg jord. Hvert rum indeholdt ca. 6 m³ jord, dvs. ca. 10 t (1,7 t/m³). Oliemængden var således 25 kg pr. rum, N-krav = 2 kg, P-krav = 0,2 kg.

Tilsætning af ortofosfat kan medføre udfældning af FePO₄·2H₂O $L = 9,92 \cdot 10^{-29}$ (25°C) eller Ca₃(PO₄)₂ $L = 2,07 \cdot 10^{-33}$ (25°C).

Koncentrationen af jern i vandet fra den nærliggende gård var 1,75 mg/l. FePO₄·2H₂O: $L = 9,92 \cdot 10^{-29} = (0,00175/55,847 \text{ mol/l}) \times (?/94,976 \text{ mol/l})$, hvilket medfører, at koncentrationen af optofosfat maksimalt måtte være $3 \cdot 10^{-22}$ g/l, hvis der skulle undgås udfældning.

Koncentrationen af Ca i det aktuelle vand kendes ikke; men da opløselighedsproduktet var lille, var der risiko for udfældning ved tilsætning af ortofosfat.

For at undgå/minimere udfældning måtte man benytte vand fra en tankvogn. Vandet blev skaffet fra Ballerup Brandvæsen, og kvaliteten af dette vand var følgende:

Fe < 0,2 mg/l; Ca < 100 mg/l; pH: 7,3-8,0 (Vandforsyningsstatistik 1991; Dansk Vandteknisk Forening, Miljøstyrelsen).

Det var desuden vigtigt at tage højde for, at næringssalte i for store koncentrationer kan medføre nedsat nedbrydningshastighed (Morgan & Watkinson, 1992).

Næringssaltene måtte derfor tilsættes ad flere omgange. Denne praksis er desuden benyttet i tidligere bioventing forsøg.

Vandet vil blive recirkuleret, indtil den påkrævede spredning er opnået.

Derudover overvejedes muligheden for at tilsætte P som metafosfat (Brown & Norris, 1993). Da der ikke havde været mulighed for at kontrollere bakteriernes udnyttelse af dette i laboratoriet, besluttedes det at benytte ortofosfat.

Det besluttedes at tilsætte næringssaltene over 2 gange, hver gang opløst i 1.400 liter vand, svarende til to opblandinger i palletankene.

P tilsættes via Na₂HPO₄ ($M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 142$); 0,1 kg P = 3,23 mol P pr. rum. Dette svarede således til, at der skulle tilsættes 459 g Na₂HPO₄ til hver rum. Da 4 rum fik tilsat næringssalte, måtte der laves 8 opblandinger i palletanken. I hver opblanding blev tilsat ca. 230 g Na₂HPO₄.

N blev tilsat via NaNO₃ og KNO₃, idet Rasiah et al. (1991) havde fundet, at nedbrydningen af olie sker hurtigere ved anvendelse af disse salte end hvis NH₄NO₃ anvendes. Selv om Ca(NO₃)₂ så ud til at give størst nedbrydning, valgtes dette salt ikke, idet der ikke ønskedes en yderligere forøgelse i koncentrationen af Ca.

1 kg N pr. rum = 71,4 mol N. Der blev tilsat 6,46 mol Na via fosfatsalte, derfor blev N tilsat via 32,5 mol NaNO_3 og 38,9 mol KNO_3 ($71,4 - 6,5 = 64,9$ mol, $64,9/2 = 32,5$ mol). Dette svarede således til, at der blev tilsat 2.763 g NaNO_3 ($M_{\text{NaNO}_3} = 85$) og 5.096 g KNO_3 til hvert rum. Da der blev lavet 8 opblandinger i palletankene, skulle der pr. opblanding tilsættes ca. 1.382 g NaNO_3 og 2.548 g KNO_3 .

Tankene blev skyllet med vand før bakteriesuspensionen blev lavet.

Dernæst tilledtes 1.200 liter vand, som skulle bruges i hvert rum ved spredningen af mikroorganismerne. Vandet recirkuleredes til den fornødne spredning var opnået. Der tilledtes bakterier til 2 rum, og der skulle således laves 3 suspensioner à 800 liter, idet suspensionen bestod af ca. 6,8 liter kultur (med 10^{13} CFU/liter) og vand.

Tankene blev skyllet med vand efter tilsætningen af bakterierne.

Totalt blev således brugt 10,4 m³ vand.

Derudover blev der brugt vand til opstart af anlægget og til vanding af de to kontroller.

Efter spredning af næringssalte og mikroorganismer afdrænede jorden for vand. Kolonneforsøget (se appendiks 9) viste, at det kunne forventes, at ca. 40% af vandet kunne afdrænes i en periode på 24 timer.

Anden tilsætning af næringssalte

Den 20. september 1993 blev der påny tilsat næringssalte. Det viste sig, at spredningen af P var tilfredsstillende ved første tilsætning. Koncentrationen af N derimod blev aldrig tilfredsstillende høj. Det besluttedes derfor at fordoble denne.

Da 1.400 liter er på grænsen af jordmatricens porevolumen, benyttes kun 600 l vand ved hver opblanding.

P tilsættes via Na_2HPO_4 ($M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 142$); 0,1 kg P = 3,23 mol P pr. rum. Dette svarede således til, at der skulle tilsættes 459 g Na_2HPO_4 til hver rum. Da 4 rum skulle tilsættes næringssalte, må der laves 8 opblandinger (à 600 l) i palletanken. I hver opblanding blev der tilsat ca. 230 g Na_2HPO_4 .

2 kg N pr. rum = 142,9 mol N. Der blev tilsat 6,46 mol Na via fosfatsalte, derfor blev N tilsat via 68,2 mol NaNO_3 og 74,7 mol KNO_3 ($142,9 - 6,5 = 136,4$ mol, $136,4/2 = 68,2$ mol). Dette svarede således til, at der blev tilsat 5.797 g NaNO_3 ($M_{\text{NaNO}_3} = 85$) og 7.545 g KNO_3 ($M_{\text{KNO}_3} = 101$) til hvert rum. Da der blev lavet 8 opblandinger i palletankene, skulle der pr. opblanding (à 600 l) tilsættes ca. 2.899 g NaNO_3 og 3.773 g KNO_3 .

Da der blev anvendt 50 kg sække, manglede ca. 568 g KNO_3 i den sidste opblanding. Dette blev erstattet med 478 g NaNO_3 .

Til kontrollerne blev der tilsat vand uden næringssalte. Der blev anvendt i alt 6 m³ vand.

Efter spredningen af næringsstofferne blev jorden drænet for vand. Vandstandsmålerne blev kontrolleret, og vandstanden skulle være på ca. 20 cm.

Udtagning af vandprøver

- To prøve fra en palletank mærket dato og pallenr. (1 eller 2)
- To fra det recirkulerede vand i hvert rum. Der recirkuleredes ca. 5 m₃ svarende til 4 porevoluminer, med en flowhastighed på ca. 1 m₃/h. Den første prøve blev udtaget efter 1 m₃ og den anden prøve efter 5 m₃.
- En prøve fra vandet, som fraledes hvert rum.
- I alt udtages således 14 prøver.

Prøverne blev analyseret for NO₃⁻-N, PO₄³⁻-P og dieselolie.

Appendix 9 Jordsøjleforsøg

Formål

Formålet med søjleforsøgene var at vurdere muligheden for at sprede de opformerede bakterier i den dieselolieforurenede sandjord. Baggrunden for at vurdere forsøgene var, at der i litteraturen angives meget forskellige spredningsegenskaber for forskellige (selv nært beslægtede) bakterier i jord. Kendskab til spredningshastigheder var en forudsætning for planlægningen af containerforsøgene.

For at kunne vurdere spredningen af mikroorganismene i jorden på en enkel måde udførtes forsøgene på steril jord, hvilket i sig selv var en væsentlig ændring i forhold til intakt jord. For at reducere omkostningerne blev forsøgene udført i plasticsøjler, der ikke kunne steriliseres. Det blev vurderet, at kontamineringsrisikoen ville være lille, når steril jord blev pakket i søjlerne, og næringssalte samt store mængder bakterier efterfølgende blev introduceret.

Materialer og metoder

Der blev konstrueret en søjle i PVC med følgende dimensioner: højde 90 cm, indre diameter 9,3 cm. Søjlen blev påsat parvise prøveudtagningsstudse med 25 cm's mellemrum og var konstrueret til at rumme 5-6 liter dieselolieforurenede sandjord ved mellemhård pakning. Jorden autoklaveredes og blev pakket til ca. 80 cm's højde under rene forhold i søjlen (teoretisk volumen 5,434 l), idet et metalvæv blev lagt i bunden for at forhindre fine sandpartikler i at blive skyllet ud af søjlen.

Jorden blev sigtet gennem 4 mm sigte og blev autoklaveret i 15 min. ved 121°C i autoklaveposer (tyndt lag). Der blev lavet steriltest af jorden.

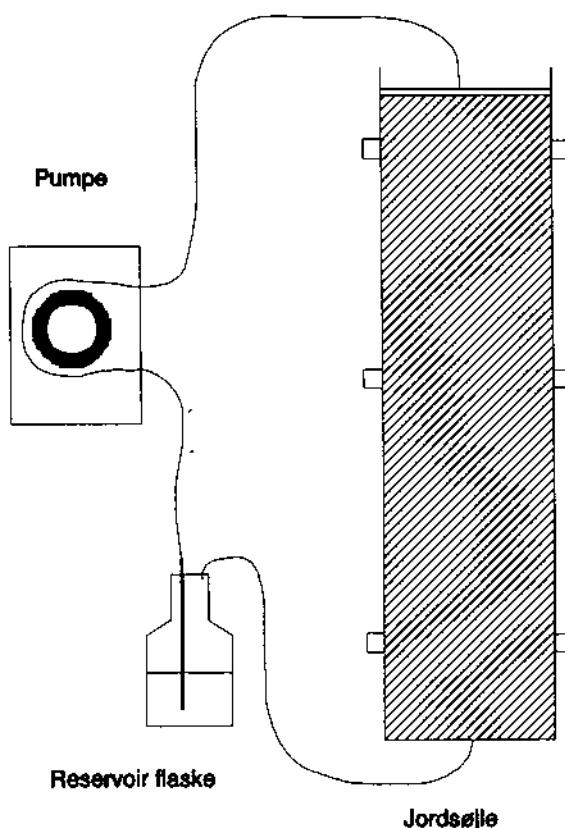
Ionbyttet vand i fødebeholder (sterilfilter på afgang) blev autoklaveret. Der blev lavet steriltest.

En næringssaltopløsning blev fremstillet. C:N:P forholdet var 120:10:1. Der blev regnet med et maksimalt C-indhold på 2.000 mg/kg. Som N-kilde anvendtes NH_4NO_3 (M_w 80,04 g/mol) og som P-kilde K_2HPO_4 (M_w 174,18 g/mol). Et C:N:P på 120:10:1 svarede til 2.000:167:16,7 mg/l eller 2.000 mg diesel, 0,48 g NH_4NO_3 og 0,094 g K_2HPO_4 /kg. Der blev lavet en stamopløsning indeholdende 238 g NH_4NO_3 og 46,8 g K_2HPO_4 i 1 liter vand (sterilfiltreret). Der blev udført steriltest, når næringssaltopløsningen var færdigblandet i det rette forhold.

DO10 opformeredes først i rystekolber, derefter i 2 liters fermentorer (se tidligere vejledninger). Indholdet af fermentorerne blev centrifugeret og vasket.

Fremgangsmåde

Opstilling: pakket jordsøjle, afløb forbundet med reservoir-flaske (indeholdende ca. 200 ml), pharmacia slangepumpe, indløb. Skitse over opstillingen:



Jorden blev efter påfyldning af ca. 5 cm jord stampet forsigtigt (for at opnå en mellemhård pakning). Slutvolumen og vægt af jorden blev noteret. Søjlen blev mættet med sterilt vand (porevolumen noteredes) ved langsom indpumpning nedefra (ca. 0,1 l/h). Bufferopløsning (koncentration blev bestemt endeligt ud fra vandvolumen samt jordmængde i søjlen) indeholdende bakterieopslæmning blev pumpet gennem søjlen oppefra med en hastighed på ca. $0,29 \cdot 10^{-4}$ m/s, svarende til 0,1044 m/h eller 2,5056 m/d, svarende til den hydrauliske ledningsevne for mellemhård pakning af jorden.

Den påsatte kultur (nedcentrifugeret og genopslæmnet i fysiologisk saltopløsning) svarende til ca. 10^7 CFU/g jord i søjlen med en koncentration i påsætningsvandet på 10^8 CFU/ml.

Næringssaltopløsningen indeholdende mikroorganismer recirkuleredes efterfølgende. Jordsøjlen henstod ved stuetemperatur. Prøver blev udtaget og kimtallet bestemt i alle prøveudtagningshøjder.

Det viste sig, at der mod forventning var en del kontamineringsproblemer. I denne rapport er derfor kun medtaget det afsluttende kolonneforsøg.

Resultater:

Data:

Jordvægt: 8.078 g

Volumen jord i søjle: 5,6 l

Volumen vand i vandmættet søjle: 1,45 l i 78 cm eller 18,6 ml/cm

Bufferpåsætningshastighed: 0,19 l/h eller 4,56 l/døgn

Kim i koncentrat $2,6 \times 10^{10}$ CFU/ml

Liter påsætningsvæske (næringssalt): 3.000 ml

CFU i påsætningsvæske: $8,1 \times 10^8$ CFU/ml

Jord til søjlen: $< 33,3$ CFU ml⁻¹ (før påsætning)

Næringssaltvand til søjlen: $< 33,3$ CFU ml⁻¹

Koncentrationen af næringssalte: 0,475 g NH₄NO₃ og 0,0936 g K₂HPO₄ pr. l svarende til en oliekoncentration på 2.000 ppm.

Dato	Kl.	Timer fra podning	pH	CFU/ml			
				Port 1 (ca. 3 cm fra indløb)	Port 2 (ca. 28 cm fra indløb)	Port 3 (ca. 58 cm fra indløb)	Udløb
22.06.93	21.00	0	7,5	Ikke muligt at udtage prøver	<333	<333	<333
23.06.93	12.00	15	7,4	-	$1,9 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$0,6 \times 10^8$
23.06.93	16.00	19	-	-	$0,8 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$
24.06.93	09.00	36	7,5	-	$0,4 \times 10^8$	$0,5 \times 10^8$	$0,4 \times 10^8$
24.06.93	16.00	43	-	-	$1,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$0,2 \times 10^8$

Kulturen blev spredt i søjlen inden for de første 15 timer = 1. prøveudtagning. Der var i dette forsøg ingen problemer med kontaminering. På kintalspladerne fra den 24.06.93 kunne der i fortyndingerne 10⁻¹ og 10⁻² ses enkelte fremmede kim. Inden for kimtællingsperioden sås ingen vækst i den autoklaverede jord. På grundlag af disse forsøg kunne det forventes, at kulturen i containerforsøgene kunne spredes gennem 1,5 m jordsøjle i løbet af et døgn. Jorden i dette forsøg var løst pakket (0,69 liter jord/kg), og den hydrauliske ledningsevne var derfor højere end den anvendte flowhastighed. I containerforsøgene, hvor jorden også var løst pakket (0,6 liter/kg), burde der derfor uden problemer kunne anvendes et højere flow. Det skal dog bemærkes, at jordsøjleforsøgene blev foretaget med kulturen DO10, mens kulturen DO7-II-1 blev udvalgt til anvendelse i containerforsøget. Denne udvælgelse var baseret på, at DO7-II-1 besad bedre olienedbrydnings-egenskaber.

Appendiks 10*Fremgangsmåde ved tilsætning af bakterier*

Det følgende er beregninger af bakteriemængder, der skønnedes behov for til inokulering af containerne og de koncentrationer, der skønnedes acceptable til brug:

Jordmængder: 2 parceller à $6,67 \text{ m}^3 = 13,34 \text{ m}^3$ eller $13,34 \times 10^3$ liter jord. Ved løs pakning af jorden svarer dette til ca. 18.800 kg jord og ved en mellemhård pakning ca. 22.400 kg jord i alt eller henholdsvis ca. 9.400 og ca. 11.200 kg pr. rum.

Inokulering: 10^7 CFU/g jord svarer til en total bakteriemængde på 188×10^{12} til 224×10^{12} CFU. Laboratorieforsøg viste, at det var muligt at opnå 10^{10} CFU/ml, og at det følgelig ville være nødvendigt at opformere 18,8 til 22,4 liter kultur.

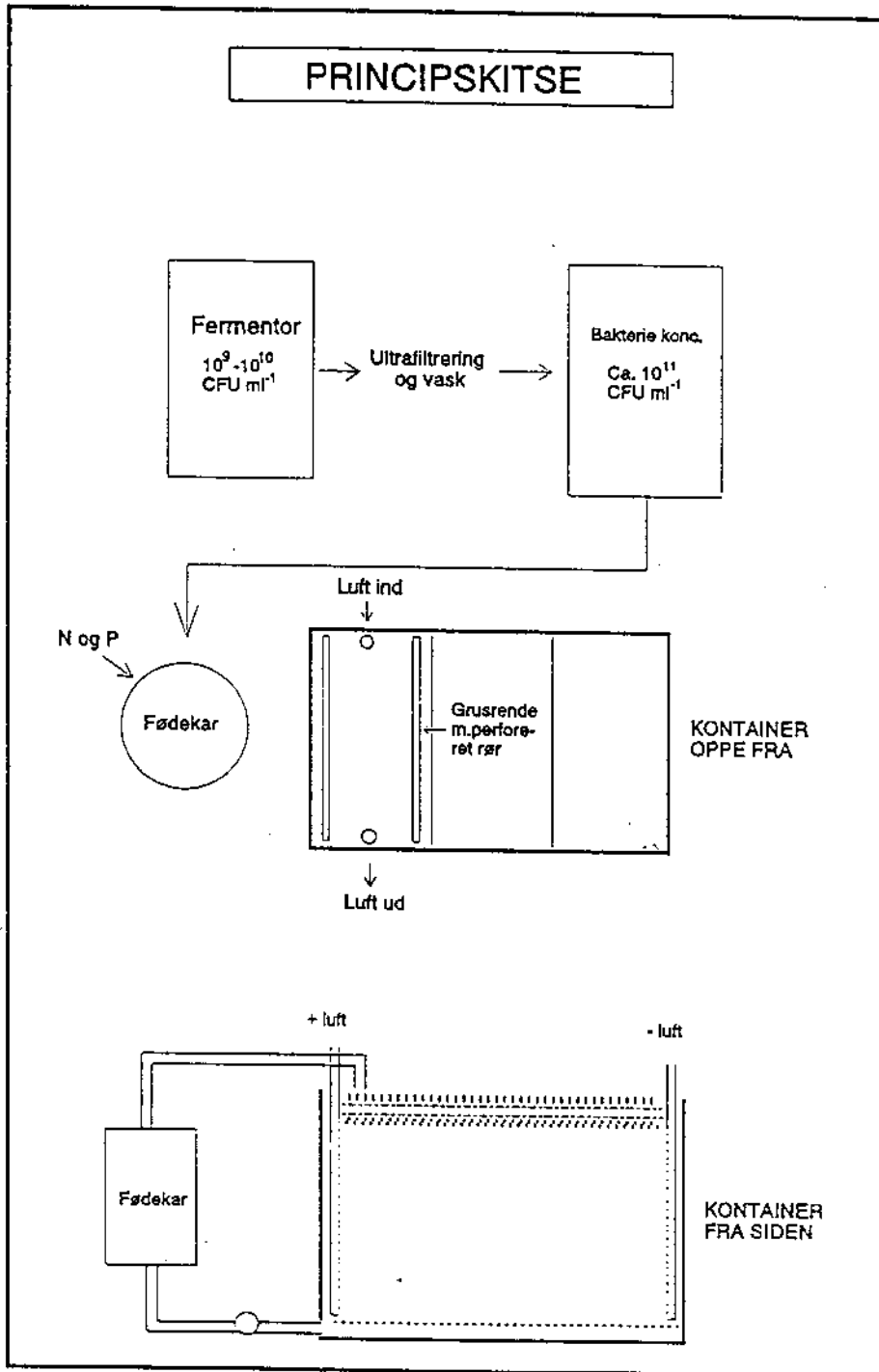
Vandmængder: For at undgå tilstopning af jorden burde den maksimale koncentration være 10^8 CFU/ml (10^{11} CFU/l). Således skulle 188×10^{12} CFU til 224×10^{12} opløses i 1.880 til 2.240 l totalt eller 940 til 1.120 l pr. rum. 18.800 til 22.400 kg jord skulle kunne indeholde ca. 0,163 til 0,094 liter vand/kg jord eller totalt 3.064 til 2.106 l eller 1.532 til 1.053 liter pr. rum.

Sammenlignet med de ovennævnte vandmængder mht. inokulering var det tydeligt, at det ville være nødvendigt at bruge større vandmængder end påkrævet blot for at opnå et bakterieindhold på 10^7 CFU/g jord. Med 10^8 CFU/ml inokuleringsvand ville det være nødvendigt at opformere ca. 21-31 liter substratvolumen af bakterier.

Inokulering kunne udføres ved 249/138 l/h - den samme pumpehastighed som ved jordsøjleforsøgene - svarende til ca. 6-8 timers pumpning. I dette tidsforløb ville kontamineringsproblemerne være mindre, da bakterieindholdet i vandet var 10^8 CFU/ml, og inokuleringen foregik i jord med et bakterieindhold på 10^6 CFU/ml.

Baseret på jordsøjleforsøgene ville recirkulering i ca. 24 timer være tilstrækkelig for at fordele bakterierne gennem jorden.

Den nødvendige tid til at tømme containeren var vanskelig at vurdere. Ifølge jordsøjleforsøgene var det muligt at pumpe ca. 30% af inokuleringsvandet ud (8 timer) og ca. 10% blev tømt passivt natten over.



Appendiks 11
Prøvetagningsplan for containerforsøget

Dato	Tid Dage	Antal jordprøver					
		CFU analyser	Diesel olie analyser	Vand- indhold	pH analyser	Nitrat analyser	Ortophospat analyser
14-Jul-93	0	18	18	18	18	18	18
20-Jul-93	6	18	18	18	18	18	18
26-Jul-93	12	18	18	18	18	18	18
02-Aug-93	19	18	18	18	18	18	18
16-Aug-93	33	18	18	18	18	18	18
30-Aug-93	47	18	18	18	18	18	18
22-Sep-93	70	18	18	18	18	18	18
06-Oct-93	84	18	18	18	18	18	18
19-Oct-93	97	18	18	18	18	18	18
03-Nov-93	112	18	18	18	24	18	18
01-Dec-93	140	18	18	18	18	18	18
04-Jan-94	174	18	18	18	18	18	18

Appendiks 12 *Analysemetode*

Bestemmelse af dieselolieindholdet

50 g jord anbragtes i 300 ml glasflasker. 100 ml Winogradskyopløsning tilsattes, hvorefter flaskerne blev anbragt på rystebord (250 o/min.) i 5 min. Der blev udtaget en 1 ml prøve fra slurry'en til bakterietællinger (se nedenfor). Slurry'en blev ekstraheret med 50 ml pentan indeholdende n-triacontan som intern standard. Flaskerne blev rystet kraftigt i hånden i 5 min., hvorefter de blev anbragt på rystebord (250 o/min.) i 1 time.

Efter centrifugering af pentanfasen blev dieselolieindholdet bestemt ved at injicere 1 μ l prøver i en Hewlett Packard 5890 gaskromatograf tilsluttet en Simadzu C-R5A integrator. Der benyttedes en 30 m x 0,532 mm DB-1 fused silica kapillarkolonne (J & V Scientific). N_2 blev benyttet som bæregas og tilførtes med en hastighed af 24,0 ml/min. Injektortemperaturen og detektortemperaturen var henholdsvis 275°C og 300°C. Der blev benyttet temperaturprogrammering: først 70°C i 5 min., derefter stigning i temperaturen til 275°C med en hastighed af 12°C/min. Denne temperatur holdtes i 12 min., hvilket gav en total analysetid på 32 min. Der blev integreret mellem 3 og 27 min., og dieselolieindholdet blev beregnet vha. en standardkurve af kendte mængder dieselolie i pentan.

Chromatogrammerne blev re-integrerede med en anden basislinie for at estimere det relative indhold af unresolved complex mixture (UCM) i prøverne.

Tælling af heterotrofe og olienedbrydende bakterier

Den totale heterotrofe bakteriepopulation blev talt ved udpladning på plate count agar tilsat 50 mg cycloheximid/l. Pladerne blev talt efter 3 dages inkubation ved 25°C.

De olienedbrydende bakterier blev talt ved udpladning på minimal-agar bestående af Muller-Hurtig medium tilsat 20 g Nobleagar (Difco)/l og tilsat 50 mg cycloheximid/l. Afkølede (5°C) præ-inokulerede agarplader blev sprayet med 5% (vol./vol.) opløsning af hexadecan i æter. Pladerne blev inkuberet i en måned ved 10°C, inden de blev talt. Kolonier, der var i stand til at danne plaques i det lysbrydende hexadecanlag, blev kategoriseret som olienedbrydende.

Bestemmelse af nitrogen og fosfor

20 g jord blev ekstraheret med 200 ml 0,1 M KCl. Slurry'en blev anbragt på rystebord (250 o/min.) i 1 time. Ca. 10 ml slurry centrifugeredes, og supernatanten blev filtreret gennem N-frie filtre, til den fremstod klar, hvorefter NO_3^- -N og PO_4^{3-} -P-indholdet blev bestemt vha. flow-injektionsteknik (Tecators' Aquatec system).

Appendiks 13 Respirationstest

TABEL Stigning i carbondioxid ved respirations test, juli, september og oktober

		Kanal 1 % CO2 stigning/min	Kanal 2 % CO2 stigning/min	Kanal 3 % CO2 stigning/min	Kanal 4 % CO2 stigning/min	Kanal 5 % CO2 stigning/min	Gennemsnit % CO2 stigning/min	Spredning
CONTAINER I	kontrol							
	luft, næringssalte N/P	1,50E-02	9,00E-03			1,00E-03	1,20E-02	4,24E-03
	luft, bakterier, N/P	5,00E-03	2,00E-03			4,00E-03	3,50E-03	2,12E-03
CONTAINER II	kontrol							
	luft, næringssalte N/P	3,00E-03	2,00E-03	2,00E-03	3,00E-03	4,00E-03	2,50E-03	5,77E-03
	luft, bakterier, N/P	7,00E-03	2,10E-02	1,40E-02	3,00E-03	4,00E-03	1,13E-02	7,93E-03
		8,00E-03	4,00E-03	4,00E-03	1,00E-02	5,00E-03	6,00E-03	2,83E-03

Kanal 1 - 4 repræsenterer resultater fra studs 1 - 18. Kanal 5 repræsenterer resultater fra studs 18 - 24 (luftindtag/luftudsug fra hvert rum). Gennemsnit er beregnet uden brug af resultaterne.
Gennemsnits temperatur = 9 °C i testperioden.

		Kanal 1 % CO2 stigning/min	Kanal 2 % CO2 stigning/min	Kanal 3 % CO2 stigning/min	Kanal 4 % CO2 stigning/min	Kanal 5 % CO2 stigning/min	Gennemsnit % CO2 stigning/min	Spredning
CONTAINER I	kontrol							
	luft, næringssalte N/P	4,14E-04	4,78E-04			2,18E-04	4,48E-04	4,53E-04
	luft, bakterier, N/P	4,08E-04	2,85E-04			2,71E-04	3,47E-04	8,70E-04
CONTAINER II	kontrol							
	luft, næringssalte N/P	3,28E-04	2,04E-04	2,80E-04		3,08E-04	2,71E-04	6,25E-04
	luft, bakterier, N/P	5,95E-04	5,17E-04	6,58E-04	1,24E-04	2,64E-04	4,73E-04	2,40E-04
		5,69E-04	5,04E-04	4,29E-04	4,97E-04	4,69E-04	5,00E-04	5,72E-04

Kanal 1 - 4 repræsenterer resultater fra studs 1 - 18. Kanal 5 repræsenterer resultater fra studs 18 - 24 (luftindtag/luftudsug fra hvert rum). Gennemsnit er beregnet uden brug af resultaterne.
Gennemsnits temperatur = 9 °C i testperioden.

		Kanal 1 % CO2 stigning/min	Kanal 2 % CO2 stigning/min	Kanal 3 % CO2 stigning/min	Kanal 4 % CO2 stigning/min	Kanal 5 % CO2 stigning/min	Gennemsnit % CO2 stigning/min	Spredning
AIRinlet								
CONTAINER I	kontrol							
	luft, næringssalte N/P	1,13E-04	9,19E-05			?	1,02E-04	1,49E-04
	luft, bakterier, N/P	4,44E-04	2,23E-04			?	3,34E-04	1,56E-04
CONTAINER II	kontrol							
	luft, næringssalte N/P	6,20E-05	5,13E-05	2,37E-04	3,10E-05	?	9,53E-05	9,53E-05
	luft, bakterier, N/P	3,18E-04	3,58E-04	3,88E-04	?	?	2,68E-04	1,80E-04
		4,80E-04	5,01E-04	3,78E-04	?	?	3,42E-04	2,35E-04

Kanal 1 - 4 repræsenterer resultater fra studs 1 - 18. Kanal 5 repræsenterer resultater fra studs 18 - 24 (luftindtag/luftudsug fra hvert rum). Gennemsnit er beregnet uden brug af resultaterne.
Gennemsnits temperatur = 9 °C i testperioden.

Appendiks 14

Hastighed for biologisk nedbrydning beregnet på baggrund af resultater af respirationstestene udført in-situ

Forudsætninger:

Porøsitet: 0,35.

Massefylde for jord: 1,67 t/m³.

Det blev antaget, at kulbrinterne i dieselolien fandtes på formen CH_{2,16}. M = 14,16 g/mol (Huling & Bledsoe, 1991).

Hvert rum i containerne rummede ca. 6 m³ ⇒ 2,1 m³ luft (n = 0,35).

6 m³ x 1,67 t/m³ = 10 t.

1. Respirationstest fra den 16.09.93 til 19.09.93

Temperatur T = 280,65 °K i perioden, tryk P = 1 atm.

Iltindholdet i indstrømningsluften blev i perioden målt til ca. 20 vol %.

2,1 m³ luft indeholdt da 0,2 x 2,1 = 0,42 m³ ilt ⇒

420 l x 1 atm / (280,65°K x 0,082057 l x atm/mol x °K) = 18,24 mol ilt.

Kuldioxidindholdet i indstrømningsgassen blev i perioden målt til ca. 0,5 vol %.

2,1 m³ luft indeholdt da 0,005 x 2,1 = 0,0105 m³ kuldioxid ⇒

10,5 l x 1 atm / (280,65°K x 0,082057 l x atm/mol x °K) = 0,4559 mol kuldioxid.

I. Kontrol

Kulbrintekonzentration: 1.166 ± 99 mg/kg jord (målt den 22.09.93)

Iltoptagelse:

Kuldioxidproduktion:

I. Luft og næringssalte

Kulbrintekonzentration: 562 ± 114 mg/kg jord (målt den 22.09.93)

Iltoptagelse: 9,60E-04 ± 8,49E-05 vol % / min.

Kuldioxidproduktion: 4,46E-04 ± 4,53E-05 vol % / min.

Biologisk nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af iltoptagelsen:

9,60E-04 ± 8,49E-05 vol % / min. ⇒ 5 x 9,60E-06 x 18,24 mol ilt/min. = 8,7552E-04 mol ilt / min. Ilden svarede til den biologiske nedbrydning af kulbrinter, 8,7552E-04 / 1,54 = 0,5685 mmol kulbrinter/min. x 10.000 kg jord (se appendiks 1). 0,5685/10.000 mmol/min. x kg x 14,16 mg/mmol = 8,050E-04 mg/min. x kg jord, 8,050E-04 mg/min. x kg x 1.400 min./dag = 1,1270 ± 0,0995 mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$4,46E-04 \pm 4,53E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 4,46E-06 \times 200 \times 0,4559$ mol kuldioxid = $4,0666E-04$ mol kuldioxid / min. Kuldioxiden svarede til den biologiske nedbrydning af kulbrinter, $4,0666E-01$ mol kulbrinter/min. $\times 10.000$ kg jord (se appendiks 1). $4,0666E-01 / 10.000$ mol/min. \times kg $\times 14,16$ g/mol = $5,7583E-04$ g / min. \times kg jord. $5,7583E-04 \times 1.400$ min./dag = $0,8061 \pm 0,0819$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

I. Luft, næringsalte og bakterier

Kulbrintekonzentration: 861 ± 283 mg/kg jord (målt den 22.09.93)

Iltoptagelse: $1,12E-03 \pm 4,45E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $3,47E-04 \pm 8,70E-05$ vol % / min.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af iltoptagelsen:

$1,12E-03 \pm 4,45E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 1,315 \pm 0,50$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$3,47E-04 \pm 8,70E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 0,627 \pm 0,157$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Kontrol

Kulbrintekonzentration: 984 ± 421 mg/kg jord (målt den 22.09.93)

Iltoptagelse: $6,64E-04 \pm 1,59E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $2,71E-04 \pm 6,25E-05$ vol % / min.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af iltoptagelsen:

$6,64E-04 \pm 1,59E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,7795 \pm 0,1865$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$2,71E-04 \pm 6,25E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 0,490 \pm 0,113$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Luft og næringsalte

Kulbrintekonzentration: 964 ± 332 mg/kg jord (målt den 22.09.93)

Iltoptagelse: $1,27E-03 \pm 4,93E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $4,73E-04 \pm 2,40E-04$ vol % / min.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af iltoptagelsen:

$1,27E-03 \pm 4,93E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 1,491 \pm 0,579$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$4,73E-04 \pm 2,40E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,855 \pm 0,434$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Luft, næringssalte og bakterier

Kulbrintekonzentration: 1.076 ± 307 mg/kg jord (målt den 22.09.93)

Iltoptagelse: $1,50E-03 \pm 2,38E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $5,00E-04 \pm 5,72E-05$ vol % / min.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af iltoptagelsen:

$1,50E-03 \pm 2,38E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 1,761 \pm 0,2795$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$5,00E-04 \pm 5,72E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 0,904 \pm 0,103$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

2. Respirationstest fra den 20.10.93 til den 27.10.93

Temperatur $T = 278^\circ\text{K}$ i perioden, tryk $P = 1$ atm.

Iltdindholdet i indstrømningsgassen blev i perioden målt til ca. 0,2 vol %.

$2,1 \text{ m}^3$ luft indeholdt da $0,207 \times 2,1 = 0,4347 \text{ m}^3$ ilt \Rightarrow

$434,7 \text{ l} \times 1 \text{ atm} / (278^\circ\text{K} \times 0,082057 \text{ l} \times \text{atm/mol} \times ^\circ\text{K}) = 19,0559 \text{ mol}$ ilt.

Kuldioxidindholdet i indstrømningsgassen blev i perioden målt til ca. 0,2 vol %.

$2,1 \text{ m}^3$ luft indeholdt da $0,002 \times 2,1 = 0,0042 \text{ m}^3$ kuldioxid \Rightarrow

$4,2 \text{ l} \times 1 \text{ atm} / (278^\circ\text{K} \times 0,082057 \text{ l} \times \text{atm/mol} \times ^\circ\text{K}) = 0,1841 \text{ mol}$ kuldioxid.

I. Kontrol

Kulbrintekonzentration: 1.034 ± 41 mg/kg jord (målt 19.10.93)

Iltoptagelse:

Kuldioxidproduktion:

I. Luft og næringssalte

Kulbrintekonzentration: 402 ± 166 mg/kg jord (målt 19.10.93)

Iltoptagelse: $1,54E-04 \pm 4,38E-05$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $1,02E-04 \pm 1,56E-04$ vol % / min.

$1,54E-04 \pm 4,38E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 0,189 \pm 0,0537$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$1,02E-04 \pm 1,49E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 0,186 \pm 0,027$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

I. Luft, næringssalte og bakterier

Kulbrintekonzentration: 443 ± 96 mg/kg jord (målt den 19.10.93)

Iltoptagelse: $7,99E-04 \pm 3,97E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $3,34E-04 \pm 1,56E-04$ vol % / min.

$7,99E-04 \pm 3,97E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,980 \pm 0,487$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$3,34E-04 \pm 1,56E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,609 \pm 0,285$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Kontrol

Kulbrintekonzentration: 1.201 ± 200 mg/kg jord (målt den 19.10.93)

Iltoptagelse: $1,96E-04 \pm 2,20E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $9,53E-05 \pm 9,53E-05$ vol % / min.

$1,96E-04 \pm 2,20E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,2404 \pm 0,270$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$9,53E-05 \pm 9,53E-05$ vol % / min. $\Rightarrow 0,174 \pm 0,174$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Luft og næringssalte

Kulbrintekonzentration: 298 ± 73 mg/kg jord (målt den 19.10.93)

Iltoptagelse: $6,09E-04 \pm 4,07E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $2,66E-04 \pm 1,80E-04$ vol % / min.

$6,09E-04 \pm 4,07E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,747 \pm 0,499$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$2,66E-04 \pm 1,80E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,485 \pm 0,328$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Luft, næringssalte og bakterier

Kulbrintekonzentration: 418 ± 70 mg/kg jord (målt den 19.10.93)

Iltoptagelsen: $7,60E-04 \pm 5,10E-04$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $3,42E-04 \pm 2,35E-04$ vol % / min.

$7,60E-04 \pm 5,10E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,932 \pm 0,626$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$3,42E-04 \pm 2,35E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 0,624 \pm 0,429$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Iloptagelse den 21.07.93

Temperatur $T = 288^\circ\text{K}$ i perioden, tryk $P = 1 \text{ atm}$.

Iltindholdet i indstrømningsgassen blev i perioden målt til ca. 20 vol %.

$2,1 \text{ m}^3$ luft indeholdt da $0,2 \times 2,1 = 0,42 \text{ m}^3$ ilt \Rightarrow

$420 \text{ l} \times 1 \text{ atm} / (288^\circ\text{K} \times 0,082057 \text{ l} \times \text{atm/mol} \times ^\circ\text{K}) = 17,77 \text{ mol ilt}$.

Kuldioxidindholdet i indstrømningsgassen blev i perioden målt til ca. 0,5 vol %.

$2,1 \text{ m}^3$ luft indeholdt da $0,005 \times 2,1 = 0,0105 \text{ m}^3$ kuldioxid \Rightarrow

$10,5 \text{ l} \times 1 \text{ atm} / (288^\circ\text{K} \times 0,082057 \text{ l} \times \text{atm/mol} \times ^\circ\text{K}) = 0,44 \text{ mol kuldioxid}$.

I. Kontrol

Kulbrintekonzentration: $1.898 \pm 170 \text{ mg/kg}$ jord (målt den 20.07.93)

Iloptagelse:

Kuldioxidproduktion:

I. Luft og næringssalte

Kulbrintekonzentration: $1.414 \pm 218 \text{ mg/kg}$ jord (målt den 20.07.93)

Iloptagelse: $3,10\text{E-}02 \pm 5,66\text{E-}03 \text{ vol \% / min}$.

Kuldioxidproduktion: $1,2\text{E-}02 \pm 4,24\text{E-}03 \text{ vol \% / min}$.

$3,10\text{E-}02 \pm 5,66\text{E-}03 \text{ vol \% / min} \Rightarrow 35,45 \pm 6,45 \text{ mg kulbrinter/dag/kg jord}$.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$1,2\text{E-}02 \pm 4,24\text{E-}03 \text{ vol \% / min} \Rightarrow 20,93 \pm 7,40 \text{ mg kulbrinter/dag/kg jord}$.

I. Luft, næringssalte og bakterier

Kulbrintekonzentration: $1.876 \pm 602 \text{ mg/kg}$ jord (målt den 20.07.93)

Iloptagelse: $1,20\text{E-}02 \pm 9,90\text{E-}03 \text{ vol \% / min}$.

Kuldioxidproduktion: $3,50\text{E-}03 \pm 2,12\text{E-}03 \text{ vol \% / min}$.

$1,20\text{E-}02 \pm 9,90\text{E-}03 \text{ vol \% / min} \Rightarrow 13,75 \pm 11,3 \text{ mg kulbrinter/dag/kg jord}$.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$3,50\text{E-}03 \pm 2,12\text{E-}03 \text{ vol \% / min} \Rightarrow 6,11 \pm 3,70 \text{ mg kulbrinter/dag/kg jord}$.

II. Kontrol

Kulbrintekonzentration: $1.687 \pm 215 \text{ mg/kg}$ jord (målt den 20.07.93)

Iloptagelse $6,75\text{E-}03 \pm 2,22\text{E-}03 \text{ vol \% / min}$.

Kuldioxidproduktion: $2,50\text{E-}03 \pm 5,77\text{E-}04 \text{ vol \% / min}$.

$6,75E-03 \pm 2,22E-03$ vol % / min. $\Rightarrow 7,7 \pm 2,55$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$2,50E-03 \pm 5,77E-04$ vol % / min. $\Rightarrow 4,36 \pm 1,01$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Luft og næringssalte

Kulbrintekonzentration: $2,062 \pm 1,140$ mg/kg jord (målt den 20.07.93)

Iltoptagelse: $2,55E-02 \pm 1,22E-02$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $1,13E-02 \pm 7,93E-03$ vol % / min.

$2,55E-02 \pm 1,22E-02$ vol % / min. $\Rightarrow 29,15 \pm 13,95$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$1,13E-02 \pm 7,93E-03$ vol % / min. $\Rightarrow 19,71 \pm 13,83$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

II. Luft, næringssalte og bakterier

Kulbrintekonzentration: $1,687 \pm 138$ mg/kg jord (målt den 20.07.93)

Iltoptagelse: $2,20E-02 \pm 4,55E-03$ vol % / min.

Kuldioxidproduktion: $6,00E-03 \pm 2,83E-03$ vol % / min.

$2,20E-02 \pm 4,55E-03$ vol % / min. $\Rightarrow 25,15 \pm 5,2$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Den biologiske nedbrydningshastighed beregnet på baggrund af kuldioxidproduktionen:

$6,00E-03 \pm 2,83E-03$ vol % / min. $\Rightarrow 10,47 \pm 4,94$ mg kulbrinter/dag/kg jord.

Appendix 15

Dieseloliekoncentration i jordprøver

Dieseloliekoncentration (mg/kg jord) i containere. Der blev ved hver prøvetagning udtaget tre jordprøver pr. containerrum.

Tid (døgn)	Container I			Container II		
	Kontrol	Beluftning nærings-salte	Beluftning Nærings- salte Bakterier	Beluftning	Beluftning Nærings-salte	Beluftning Nærings- salte Bakterier
0	1.970	1.480	1.874	2.119	1.773	2.017
	1.961	2.030	2.975	1.222	5.495	2.212
	2.177	1.702	2.212	2.042	2.786	2.077
6	2.018	1.492	2.548	1.444	3.359	1.613
	1.703	1.168	1.385	1.768	1.221	1.601
	1.974	1.583	1.694	1.850	1.606	1.846
12	1.653	1.001	1.190	1.689	1.339	1.583
	1.886	1.094	2.356	634	1.300	1.800
	-	1.163	1.460	1.841	1.419	-
19	1.835	798	785	1.753	1.920	2.194
	1.920	859	1.167	836	1.216	1.391
	-	744	1.110	1.226	1.250	1.526
33	1.597	1.027	1.000	1.432	1.325	2.106
	1.123	749	1.074	1.704	961	1.884
	1.444	736	1.521	917	1.021	1.117
47	1.490	599	858	1.061	594	1.403
	1.446	596	1.376	1.353	707	722
	1.498	880	1.030	1.434	916	1.023
70	1.255	456	699	1.460	599	864
	1.183	546	1.188	833	1.248	935
	1.059	683	695	659	1.045	1.428
84	1.018	436	823	815	496	716
	1.241	404	687	1.427	588	665
	1.329	355	510	1.286	568	623
97	1.070	301	338	972	261	477
	1.045	311	465	1.297	251	341
	989	594	527	1.336	382	436
112	1.159	315	435	1.122	414	375
	1.173	326	236	436	579	505
	1.185	337	371	1.275	307	-

Registreringsblad

Udgiver: Miljø- og Energiministeriet. Miljøstyrelsen
Strandgade 29, 1401 København K
telefon 32660100 telefax 32660479 <http://www.mst.dk>

Serietitel, nr.: Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, 20/1999

Udgivelsesår: 1999

Titel:

Biologisk rensning af dieselolieforurenede jord

Undertitel:

Fase 1 : Bioventingforsøg udført under simulerede in-situ betingelser

Forfatter(e):

Kirkebjerg, Kristian; Winther, Pia; Westermann, Peter; Møller, Jacob; Lund, Bente

Udførende institution(er):

Carl Bro as; Københavns Universitet. Afdelingen for Generel Mikrobiologi; Teknologisk Institut. Miljø. Sektion for Bioteknik

Resumé:

Rapporten beskriver forsøg på at stimulere den biologiske nedbrydning af dieselolie i sandjord under in-situ betingelser i en periode på 112 døgn. Optimeringen af nedbrydning blev foretaget ved tilførsel af luft (bioventing), tilsætning af næringssalte og inokulering med bakterier. Forsøget blev udført på jord med ca. 2000 mg diesel/kg jord anbragt i containere. Der er foretaget en sammenligning mellem koncentration før og efter nedbrydning er stimuleret, og nedbrydningshastigheden er beregnet ud fra respirationsdata. Forskellen i graden af nedbrydning ved de forskellige metoder diskuteres.

Emneord:

jord; rensning; mikrobiologisk nedbrydning; metodik; dieselolie; sand

Andre oplysninger:

Md./år for redaktionens afslutning: januar 1994

Sideantal: 106

Oplag: Denne publikation udkommer ikke i trykt format

ISBN: 87-7909-527-5

ISSN: 0908-9195

Må citeres med kildeangivelse