

Miljøprojekt Nr. 613 2001

Teknologiudviklingsprogrammet for  
jord- og grundvandsforurening

## MTBE-nedbrydning i grundvand vha. alkanoxiderende mikroorganismer

Fase 1: Resultater og vurdering

Per Loll og Claus Larsen  
Dansk Miljørådgivning A/S

Kaj Henriksen, Rasmus Johansen, Laila Kleis Pedersen og  
Steingerður Gná Kristjánsdóttir  
Aalborg Universitet, Afdeling for Miljøteknik

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

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

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

# Indhold

FORORD .....	4
RESUMÉ .....	5
SUMMARY.....	6
1 INDLEDNING.....	7
1.1 Baggrund.....	7
1.2 Formål og projektstruktur .....	8
2 LABORATORIEARBEJDE OG RESULTATER .....	9
2.1 Opformering og screening af berigelseskulturer .....	9
2.1.1 Procedure for berigelse og opformering.....	9
2.1.2 Screening af propanoxiderende kulturer.....	11
2.2 Yderligere selektion med iso-alkaner .....	13
2.2.1 Procedure for berigelse og opformering.....	13
2.2.2 Screening efter yderligere selektion .....	14
2.3 Nedbrydningskinetik for primærsubstrat.....	16
2.4 Nedbrydningskinetik for MTBE.....	18
2.5 Bestemmelse af maksimale væksthastigheder.....	20
3 PERSPEKTIVER FOR ON-SITE RENSNING AF GRUNDEVAND .....	23
3.1 Korrektion for temperatur og biomassekoncentration.....	23
3.2 Korrigerede nedbrydningsrater .....	24
3.3 Overslagsberegninger .....	26
4 SAMMENFATNING .....	28
5 REFERENCER.....	30
Bilag A: Laboratorieprocedurer.....	32
A.1: Screening af propanoxiderende kulturer .....	32
A.2: Screening efter yderligere selektion .....	32
A.3: Nedbrydningskinetik for primærsubstrat.....	33
A.4: Nedbrydningskinetik for MTBE .....	33
A.5: Bestemmelse af maksimale vækstrater.....	33
Bilag B: Berigelsesprocedure .....	34
Bilag C: Biomasse standardkurver (OD <sub>550</sub> – protein) .....	35
Bilag D: Resultater.....	36
D.1: Screening for bedste substrat.....	36
D.2: Nedbrydningskinetik for primærsubstrat .....	37
D.3: Nedbrydningskinetik for MTBE .....	37
D.4: Bestemmelse af maksimale væksthastigheder.....	38

# Forord

Denne rapport skitserer de foreløbige resultater fra et samarbejdsprojekt mellem Dansk Miljørådgivning A/S og Afdeling for Miljøteknik, Aalborg Universitet. Projektet er udført under og finansieret af Miljøstyrelsens Teknologiuudviklingsprogram for jord- og grundvandsforurening.

Rapporten er udarbejdet af Per Loll og Claus Larsen, Dansk Miljørådgivning A/S, samt Kaj Henriksen, Afdeling for Miljøteknik på Aalborg Universitet.

Rapporten er udarbejdet på baggrund af laboratorieundersøgelser udført af Rasmus Johansen, Laila Kleis Pedersen og Steingerður Gná Kristjánsdóttir, Afdeling for Miljøteknik på Aalborg Universitet.

# Resumé

## *Formål*

Formålet med dette projekt er, at undersøge om MTBE-forurenede grundvand, i forbindelse med afværgepumpninger, kan renses cost-effektivt i en on-site bioreaktor vha. alkanoxiderende mikroorganismer. Denne rapport skitserer resultaterne af en række batchforsøg, der har haft til formål at danne grundlag for en indledende vurdering af metodens tekniske potentiale.

## *MTBE-nedbrydende berigelseskulturer*

Ud fra sphagnumholdig havejord har det været muligt at opformere tre forskellige berigelseskulturer af mikroorganismer med potentiale til co-metabolisk nedbrydning af MTBE. Der er således konstateret MTBE-nedbrydning af kulturer beriget med hhv. propan, isobutan og isopentan. På trods af, at den isopentanberigede kultur umiddelbart udviste det største MTBE-nedbrydningspotentiale blev det, af håndteringsmæssige årsager, fravalgt at arbejde videre med denne kultur.

## *Nedbrydning af MTBE*

Der er for de propan- og isobutanberigede kulturer observeret MTBE-nedbrydningsrater på hhv. 10,1 og 15,7 mg MTBE/(g protein-time). Der er indledende fundet halvmætningskonstanter,  $K_m$ , for MTBE-nedbrydning på ca. 130 – 150 mg MTBE/L.

## *Omsætning af substrat*

For omsætningen af propan er der fundet en maksimal omsætningsrate,  $v_{max}$ , på 405 mg propan/(g protein-time) og en halvmætningskonstant,  $K_m$ , på 9 mg propan/L. For isobutan er der tilsvarende fundet  $v_{max}$  - og  $K_m$  - værdier på hhv. 289 mg isobutan/(g protein-time) og 3,5 mg isobutan/L.

## *Mikrobielle væksthastigheder*

Der er fundet maksimale væksthastigheder,  $\mu_{max}$ , på ca. 0,5 til 1,2  $d^{-1}$ . Disse væksthastigheder vurderes ikke at være tilstrækkelige til at sikre opretholdelse af biomassekoncentrationen i en given on-site reaktor og der bør etableres en enhed til tilbageholdelse af biomasse.

## *Overslagsmæssig dimensionering*

Ved overslagsmæssig dimensionering af en optimeret bioreaktor med isobutanoxiderende mikroorganismer, kan der f.eks. ved 90% massefjernelse samt en hydraulisk belastning på 2  $m^3$ /time beregnes et nødvendigt reaktorvolumen på ca. 4,6  $m^3$ .

## *Potentiale for on-site rensning*

Samlet vurderes det, at der forholdsvis simpelt kan fremelskes mikroorganismer med potentiale til nedbrydning af MTBE samt at være sandsynliggjort, at disse kulturer har potentiale til massefjernelse i forbindelse med on-site rensning af MTBE-forurenede grundvand i en bioreaktor.

# Summary

## *Purpose*

The purpose of this project is to investigate whether MTBE contaminated groundwater can be treated cost-effectively in on-site bioreactors containing alkane-oxidizing microorganisms. This report summarizes the results from a series of batch tests with the purpose of revealing the technical potential of the method.

## *MTBE degrading enrichment cultures*

Three different alkane-oxidizing enrichment cultures with potential for co-metabolic MTBE degradation were obtained from peat enriched garden soil. Hence, co-metabolic degradation of MTBE was demonstrated for cultures enriched with propane, iso-butane, and iso-pentane. Although the culture enriched with iso-pentane exhibited the greatest degradation potential of the three cultures examined, this culture was excluded from further study due to substrate handling problems.

## *Degradation of MTBE*

MTBE degradation rates of 10.1 and 15.7 mg MTBE/(g protein·h) were observed for the propane and iso-butane enriched cultures, respectively. Preliminary results suggests half-saturation constants,  $K_m$ , for MTBE degradation of approx. 130 – 150 mg MTBE/L.

## *Substrate degradation*

For the propane-oxidizing culture, a maximum degradation rate,  $v_{max}$ , of 405 mg propane/(g protein·h) and a half-saturation constant,  $K_m$ , of 9 mg propane/L were found. For iso-butane,  $v_{max}$  and  $K_m$  were found at 289 mg iso-butane/(g protein·h) and 3.5 mg iso-butane/L.

## *Microbial growth rates*

Maximum microbial growth rates of approx. 0.5 to 1.2 d<sup>-1</sup> were found. These growth rates are not sufficient for ensuring the necessary biomass concentration in an on-site bioreactor, and a unit for biomass retention should be installed.

## *Preliminary reactor dimensions*

Preliminary dimensions can be estimated for an optimized on-site bioreactor designed for e.g. 90% mass removal and a hydraulic load of 2 m<sup>3</sup>/hour. Based on the results for the iso-butane oxidizing microorganisms a necessary volume of approx. 4.6 m<sup>3</sup> is calculated.

## *Potential for on-site treatment*

In conclusion, it has been shown that it is relatively easy to produce enrichment cultures of microorganisms with a potential for MTBE degradation. It has also been shown that these cultures has a MTBE mass removal potential for groundwater treatment in on-site bioreactors.

# 1 Indledning

## 1.1 Baggrund

### *MTBE i oppumpet grundvand*

I forbindelse med afværgepumpning på MTBE-forurenedede grunde oppumpes ofte grundvand indeholdende MTBE og evt. andre benzinrelaterede forureningskomponenter, herunder BTEX'er.

### *On-site rensning*

På grund af MTBE's relativt høje vandopløselighed og dårlige adsorptionsegenskaber, set i forhold til f.eks. BTEX'er og chlorerede opløsningsmidler, er der ikke umiddelbart nogen af de almindeligvis anvendte on-site teknikker, der er cost-effektive som eneste behandlingsenhed til rensning af MTBE-forurenede grundvand, sammenlignet med løsninger til rensning for f.eks. BTEX'er (Skøt, 1998; Keller et al., 2000a).

### *Aktiv-kulfiltrering*

Hvor aktiv-kulfiltrering er en velkendt og cost-effektiv metode til on-site rensning af oppumpet grundvand for indhold af f.eks. BTEX'er noteres det ofte, at aktiv-kul løsninger ikke umiddelbart udgør nogen hverken teknisk eller økonomisk optimal løsning til on-site rensning af MTBE-forurenede grundvand (Stub, 1998). Dette udsagn skal bl.a. ses i lyset af, at kulforbruget under sammenlignelige betingelser er ca. en faktor 10 større ved rensning for MTBE end ved rensning for BTEX'er (Arvin og Broholm, 2001).

Keller et al. (2000a) har således beregnet, at det er ca. 2 - 4 gange dyrere at rense for MTBE end for benzen ved en indløbskoncentration på 1 mg/L og et flow på mellem 2 – 20 m<sup>3</sup>/time. I (Miljøstyrelsen, 1999) anføres det dog, at rensning for MTBE ikke nødvendigvis vil fordyre en afværgeforanstaltning baseret på aktiv-kulfiltrering væsentligt, hvis der alligevel skal fjernes BTEX'er, og når kapitalomkostningerne udgør en væsentlig andel af de samlede omkostninger i forbindelse med afværgeforanstaltningen.

### *Kombination af on-site teknikker*

F.eks. har Keller et al. (2000b) dog vist, at der ved at kombinere forskellige teknikker; f.eks. air stripping, membranfiltrering og aktiv-kulfiltrering, kan opnåes cost-effektivt til meget lave MTBE-koncentrationer.

### *Teknikker specielt egnede til MTBE*

Det vurderes dog, at der er basis for at udvikle og afprøve alternative teknikker, der ved at være specielt designede til behandling af MTBE-forurenede grundvand, kan være cost-effektive i forhold til teknikker, der oprindeligt er designet til frarensning af andre forureningskomponenter.

### *Biofiltre*

Biologiske filtre, baseret på mikroorganismer, der direkte eller indirekte omsætter MTBE, kan potentielt udfylde en plads i rækken af on-site tek-

nikker til rensning for MTBE (Miljøstyrelsen, 1999). Rensning i biofiltre har endvidere potentiale til omdannelse af MTBE til ufarlige nedbrydningsprodukter.

Biofiltre kan enten benyttes som eneste løsning eller i kombination med konventionelle on-site løsninger til for- og/eller efterbehandling af det forurenede grundvand, alt afhængigt af de aktuelle mikroorganismers nedbrydningsmæssige egenskaber og deres robusthed overfor øvrige forureningskomponenter.

#### *Biologisk nedbrydning af MTBE*

Selvom der generelt er bred enighed om, at MTBE er forholdsvis svært bionedbrydeligt, især in-situ, (Miljøstyrelsen, 1998), foreligger der i litteraturen flere eksempler på, at f.eks. alkanoxiderende mikroorganismer med held er benyttet til at omsætte MTBE cometabolisk (Steffan et al., 1997; Heick og Sørensen, 1999; Hyman og O'Reilly, 1999). Nærværende projekt tager afsæt i resultaterne opnået i disse studier.

## **1.2 Formål og projektstruktur**

### *Formål*

Formålet med det nærværende projekt er, gennem en række laboratorieforsøg, at afklare om der er teknisk og økonomisk potentiale i at rense MTBE-forurenede grundvand i en bioreaktor indeholdende en berigelseskultur af alkanoxiderende mikroorganismer.

### *Projektstruktur*

Projektets laboratoriarbejde er opdelt i to faser:

1. Første fase omfatter en række batchforsøg til indledende afklaring af metodens tekniske potentiale i forhold til on-site rensning af MTBE-forurenede grundvand.
2. Anden fase vil primært omhandle indkøring og drift af en laboratorieskala bioreaktor samt fastlæggelse af optimale driftsbetingelser for denne.

### *Samlet vurdering*

På baggrund af resultaterne fra begge faser vil der blive foretaget en samlet vurdering af metodens tekniske og økonomiske potentiale.

### *Nærværende rapport*

Nærværende rapport har til formål at beskrive projektets status efter første fase.



## 2 Laboratoriearbejde og resultater

### *Undersøgte primærsubstrater*

I det oprindelige projektoplæg var der lagt op til at undersøge potentialet i en bioreaktor med propanoxiderende mikroorganismer, men på baggrund af resultaterne i et nyere amerikansk studie af *Hyman og O'Reilly* (1999) blev det, efter de indledende forsøg, besluttet at inddrage to andre alkaner, hhv. isobutan og isopentan, som mulige primærsubstrater.

### *Forsøg i projektets første fase*

For at undersøge om der er teknisk potentiale i at oprense MTBE-forurenede grundvand i en on-site bioreaktor indeholdende en berigelseskultur af propan-, isobutan- eller isopentanoxiderende mikroorganismer blev der i projektets første fase udført følgende laboratorieforsøg:

1. Opformering og screening af berigelseskulturer.
2. Yderligere selektion med iso-alkaner.
3. Nedbrydningskinetik for primærsubstrat.
4. Nedbrydningskinetik for MTBE.
5. Bestemmelse af maksimale væksthastigheder.

### *Vurdering af teknisk potentiale*

De opnåede resultater vil danne grundlag for en vurdering af om det er muligt at tilvejebringe berigelseskulturer med potentiale til at nedbryde MTBE. Resultaterne vil endvidere give et indtryk af hvilke nedbrydningshastigheder, der kan opnås for MTBE samt hvilken tilsætning af substrat, der modsvarer denne MTBE-nedbrydning. Resultaterne kan på denne baggrund give et indledende billede af mulige dimensioner på en on-site bioreaktor i forhold til krav om massefjernelse (% MTBE fjernet).

### *Laboratorieprocedurer*

En række detaljer omkring fremgangsmåden i forbindelse med de gennemførte forsøg er nærmere beskrevet i bilag A.

## 2.1 Opformering og screening af berigelseskulturer

### *Tilvejebringelse af mikroorganismer*

Denne del af projektet havde til formål at tilvejebringe naturligt forekommende mikroorganismer med potentiale til nedbrydning af MTBE. Proceduren er baseret på et tidligere studie udført ved Afdeling for Miljøteknik, Aalborg Universitet (Heick og Sørensen, 1999). Berigelsesproceduren er gengivet skematisk i figur B.1, bilag B.

### 2.1.1 Procedure for berigelse og opformering

### *Berigelse af jordprøver*

Tre forskellige berigelseskulturer blev indledende fremelsket ved udtagning af 100 g sphagnumholdig havejord til inkubering ved 23°C i 1 L flasker med gastætte propper. De tre flasker blev tilsat vand, propan og MTBE som specificeret i tabel 2.1. Gasfasen i flaskerne blev udskiftet ca. hver anden uge med frisk atmosfærisk luft og propan.

**Tabel 2.1:** Stimulering af berigelseskulturer i jord.

	Jord [g]	Vand [mL]	Propangas [mL]	MTBE [mg/kg jord]
<b>Flaske 1</b>	100	10	50	0
<b>Flaske 2</b>	100	10	50	1.000 *
<b>Flaske 3</b>	100	10	0	1.000 *

\* = 100 mg MTBE opløst i 10 ml vand, tilsat 100 g jord

#### *Overførsel til mineralmedie*

Efter ca. en måned blev der udtaget 2 gange 5 g jord fra hver flaske til selektion og opformering af de tre berigelseskulturer. Jorden blev tilsat 150 mL vækstmedie (pH ≈ 7), indeholdende bl.a. mikro- og makronæringsstoffer, samt MTBE og propan som angivet i tabel 2.2. Inkubationen blev foretaget i 0,5 L flasker med gastætte propper ved 30°C og blev omrystet ved 150 rpm. Propantilsætningen til flaske 1 og 2 svarer til en væskefasekoncentration på ca. 3,1 mg/L. Gasfasen i flaskerne blev udskiftet ca. hver anden dag med frisk atmosfærisk luft, hvorefter der blev tilsat propan som angivet i tabel 2.2.

**Tabel 2.2:** Selektion og opformering af kulturer i væskesuspension.

	Jord [g]	Vækstmedie [mL]	Propan [mL]	MTBE [mg/L]
<b>Flaske 1 (a, b)</b>	5	150	17,5	0
<b>Flaske 2 (c, d)</b>	5	150	17,5	100
<b>Flaske 3 (e, f)</b>	5	150	0	100

#### *Selektion og opformering*

Efter en uge blev 5 mL repræsentativ væskeblanding, efter grundig omrystning, udtaget fra hver flaske og overført til nye 0,5 L flasker med 145 mL frisk vækstmedie. Disse flasker inkuberedes derefter under samme forhold som beskrevet ovenfor. For at sikre tilstrækkelig selektion af de propanoxiderende bakterier blev proceduren gentaget tre gange.

#### *Observeret vækst*

Under selektions- og opformeringsprocessen observeredes der visuelt en betydelig bakterievækst i kulturerne beriget med propan (flaske 1 og 2), mens der kun blev observeret begrænset vækst i kulturen beriget alene med MTBE (flaske 3). Disse indledende observationer vedr. mikroorganismernes vækst stemmer overens med det forventede, da der i litteraturen generelt er observeret betydeligt højere vækstrater for mikroorganismer, der benytter alkaner som primærsubstrat end for mikroorganismer der anvender MTBE som eneste energi- og kulstofkilde; f.eks. (Salanitro et al., 1994; Garnier et al., 1999).

### **2.1.2 Screening af propanoxiderende kulturer**

#### *Screening af propanoxiderende kulturer*

Til afklaring af hvilken af de afprøvede berigelsesprocedurer, der medfører en bakteriekultur med det største MTBE-nedbrydningspotentialer blev der foretaget en indledende screening af hver kultur. Idet der ikke var sket en nævneværdig vækst i flaske 3, der kun blev beriget med MTBE, blev

denne kultur ikke medtaget i screeningen. Kulturen blev fortsat opformet til screening i projektets fase 2.

#### *Fremgangsmåde*

Kulturene blev placeret i serumflasker ved 23°C og MTBE-koncentrationen blev monitoreret over en periode på ca. 75 timer. Den nærmere fremgangsmåde ved screeningen er beskrevet i bilag A.1.

#### *Resultater*

Tabel 2.3 viser de opnåede resultater, herunder MTBE-nedbrydningsrater, for berigelseskulturene i flaske 1 og 2 samt for parallelle blindtests til dokumentation af, at der ikke skete abiotisk fjernelse af MTBE i serumflaskerne (Blind A og B).

**Tabel 2.3:** Screening for berigelseskulturernes MTBE-nedbrydningsrater ved 23°C.

Flaske	OD <sub>550</sub> [-]	Biomasse [mg protein/L]	Fjernet [%]	Rate* [mg MTBE/L/time]	Rate# [mg MTBE/(g protein-time)]
<b>1 (a)</b>	0,536	89,2	57	0,076	0,85
<b>1 (b)</b>	1,12	185	98	0,59	3,2
<b>2 (c)</b>	0,514	85,6	96	0,53	6,2
<b>2 (d)</b>	0,315	53,0	82	0,31	5,8
<b>Blind A</b>	-	-	1,0	0,0026	-
<b>Blind B</b>	-	-	2,7	0,00024	-

\* = Absolut nedbrydningsrate.

# = Specifik nedbrydningsrate korrigeret for biomassekoncentrationen.

#### *% MTBE fjernet over ca. 75 timer*

Som det ses af tabel 2.3 er der i de fire serumflasker observeret fjernelse af mellem 57 og 98% af den tilsatte MTBE-mængde over forsøgsperioden på ca. 75 timer. Den abiotiske fjernelse (Blind A og B) er tilsvarende fundet til 1 – 2,7%. De abiotiske fjernelsesrater blev i en statistisk test konstateret ikke at være signifikant forskellige fra nul ( $H_0$ : hældning = 0; p-værdi lig hhv. 0,8 og 0,98).

#### *Specifikke nedbrydningsrater for MTBE*

For de to undersøgte berigelseskulturer af propanoxiderende bakterier (flaske 1 og 2) vurderes det på baggrund af resultaterne i tabel 2.3, at der opnås de højeste MTBE-nedbrydningsrater for kulturen beriget med både propan og MTBE. De specifikke nedbrydningsrater er således ca. 2 – 7 gange større for kulturen beriget med både MTBE og propan end for kulturen beriget kun med propan. Disse resultater stemmer umiddelbart med det forventede og kan forklares ved, at MTBE virker hæmmende/toksisk på en del af biomassen for kulturen beriget med propan alene, idet denne kultur ikke er vant til MTBE. For kulturen beriget med både propan og MTBE forbliver hele biomassen derimod aktiv idet kulturen allerede er vant til tilstedeværelsen af MTBE.

#### *Berigelse med propan og MTBE bedst*

Da kulturen beriget med både propan og MTBE udviste det største nedbrydningspotentiale i forhold til MTBE-nedbrydning blev det valgt at udføre de efterfølgende forsøg med denne berigelseskultur.

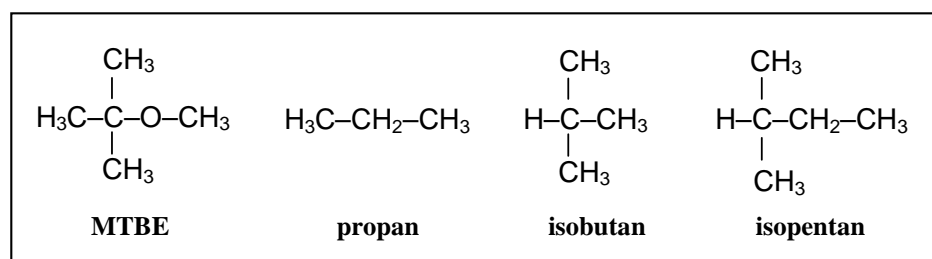
## 2.2 Yderligere selektion med iso-alkaner

### Amerikanske resultater med forgrenede alkaner

Der er i et amerikansk studie påvist højere MTBE-nedbrydningsrater med bl.a. isobutan og isopentan, end med propan som primærsubstrat (Hyman og O'Reilly, 1999). På baggrund af resultaterne i dette studie blev det besluttet, sideløbende med opformering af berigelseskulturen tilsat MTBE og propan, at selekttere den propanoxiderende berigelseskultur yderligere ved tilsætning af hhv. isobutan og isopentan samt efterfølgende at undersøge de tre kulturer for potentiale i forhold til cometabolisk nedbrydning af MTBE.

### Strukturlighed mellem substrat og MTBE

Årsagen til, at f.eks. isobutan og isopentan muligvis er mere effektive til induktion af MTBE-nedbrydning kan være, at disse molekyler, med deres forgrenede molekylestrukturer, i højere grad ligner MTBE end tilfældet er for propan, jf. figur 2.1.



Figur 2.1: Strukturformler for MTBE, propan, isobutan og isopentan.

### 2.2.1 Procedure for berigelse og opformering

#### Fremgangsmåde

Den yderligere selektion og opformering med isobutan og isopentan samt opformering med propan blev, efter grundig omrystning, foretaget ved at udtage tre gange 5 mL repræsentativ væskeblanding fra kulturen tilsat propan og MTBE og overføre den til nye 0,5 L flasker med 245 mL frisk vækstmedie. Flaskerne blev herefter lukket med teflonbelagte gummi-propper og tilsat substratgasser, i mængderne angivet i tabel 2.4, svarende til væskefasekoncentrationer på ca. hhv. 31 mg propan/L, 24 mg isobutan/L og 1,3 mg isopentan/L. Flaskerne blev inkuberet ved 30°C og omrystning ved 150 rpm. i ca. 14 dage. Gasfasen i flaskerne blev med 2 – 3 dages mellemrum udskiftet med frisk atmosfærisk luft og tilsat substrat, som angivet i tabel 2.4.

Tabel 2.4: Opformering af berigelseskulturer i væskesuspension.

	Primærsubstrat	Vækstmedie [mL]	Substrat [mL]
<b>Flaske A</b>	Propan	250	125
<b>Flaske B</b>	Isobutan	250	125
<b>Flaske C</b>	Isopentan	250	6

### *Tilsætning af isopentan*

Den lavere tilsætning af isopentan blev valgt på baggrund af et studie af (Garnier et al., 1999), der opnåede maksimal væksthastighed for pentan-oxiderende bakterier ved en koncentration på 0,085 mg pentan/L. Der blev således lavet to forskellige berigelser; én hvor der blev tilsat 4 mL isopentangas (svarende til 0,083 mg isopentan/L) og én hvor der blev tilsat 6 mL isopentangas, jf. tabel 2.4. Der blev observeret kraftigst vækst i kulturen tilsat 6 mL, hvorfor denne berigelse benyttedes til de efterfølgende forsøg.

### **2.2.2 Screening efter yderligere selektion**

#### *Bedste primærsubstrat*

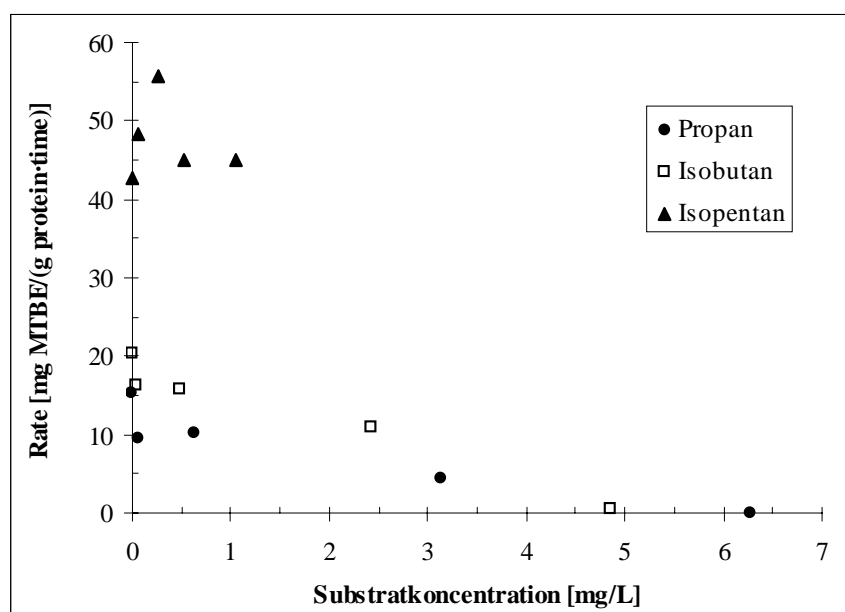
Der er udført nedbrydningsforsøg med de tre kulturer, beriget med hhv. propan, isobutan og isopentan, for dels at afgøre hvilket substrat, der medfører det største omsætningspotentiale for MTBE og dels for, om muligt, at fastlægge den optimale tilsætning af primærsubstrat, set i forhold til MTBE-nedbrydning.

#### *Fremgangsmåde*

Screeningen er udført ved fem forskellige koncentrationsniveauer for hvert primærsubstrat. Kulturerne blev placeret i serumflasker ved 23°C og MTBE-koncentrationen blev monitoreret over en periode på ca. 24 timer. Den nærmere fremgangsmåde ved screeningen er beskrevet i bilag A.2.

#### *Resultater*

MTBE-nedbrydningsraten for de tre berigelseskulturer ved fem forskellige koncentrationer af hvert primærsubstrat fremgår af tabel D.1 i bilag D. Resultaterne er afbildet i figur 2.2.



**Figur 2.2:** MTBE-nedbrydningsrate som funktion af primærsubstrat-koncentration.

#### *Isopentanoxiderende bakterier*

Som det fremgår af figur 2.2 er der observeret ca. 125 til 400% højere nedbrydningsrater for kulturen beriget med isopentan end for de øvrige kulturer. Resultaterne for den isopentanoxiderende kultur tyder således umiddelbart på, at der er et væsentligt potentiale for at benytte dette primærsubstrat ved cometabolisk omsætning af MTBE. Desværre blev der, ved høje koncentrationer af isopentan, observeret delvis opløsning af de tefloncoatede gummipropper, der benyttes til lukning af serumflaskerne. Isopentan er samtidig det af substraterne, der er mindst vandopløseligt og sværest at håndtere i praksis, hvorfor det umiddelbart blev vurderet uegnet til brug i feltapplikationer. Det ligger dog uden for rammerne af nærværende projekt at undersøge om de praktiske problemer med håndteringen af substratet kan løses, hvorfor der ikke blev udført yderligere forsøg med den isopentanberigede kultur.

#### *Propan- og isobutanoxiderende bakterier*

Som det fremgår af figur 2.2 blev der for kulturen beriget med isobutan observeret MTBE-nedbrydningsrater, der var ca. 30 – 75% højere end for kulturen beriget udelukkende med propan. Da der samtidig ikke er problemer med håndteringen af isobutan blev denne berigelseskultur medtaget i det efterfølgende forsøgsprogram.

#### *Substratinhibering*

For propan og isobutan blev der observeret faldende MTBE-nedbrydningsrater ved øget tilsætning af primærsubstrat, samt maksimale rater uden tilsætning af primærsubstrat. Dette indikerer umiddelbart, at der er tale om en form for substratinhibering mellem primærsubstrat og cosubstrat (MTBE), hvor primærsubstrat og cosubstrat kæmper om et endeligt antal enzymer. Det vurderes dog, at raterne opnået uden tilsætning af primærsubstrat ikke kan opretholdes over længere perioder, idet der kræves en vis mængde substrat for at dække mikroorganismernes energibehov til basalmetabolisme samt opretholdelse af deres enzymsystem.

#### *Optimal primærsubstratkoncentration*

I forhold til optimal tilsætning af primærsubstrat er der stort set observeret uændrede MTBE-nedbrydningsrater for de to kulturer indenfor en faktor 10 af substratkoncentration, jf. figur 2.2. MTBE-nedbrydningsraten for den propanoxiderende berigelseskultur er således stort set uændret i koncentrationsintervallet 0,06 – 0,6 mg propan/L, mens raten for den isobutanoxiderende kultur stort set er uændret i koncentrationsintervallet 0,05 – 0,5 mg isobutan/L. På baggrund af de foreliggende resultater kan det ikke afgøres, hvor i koncentrationsintervallet der opnås den optimale afvejning mellem opretholdelse af enzymaktiviteten og substratinhibering, hvorfor denne problemstilling vil blive forsøgt nærmere afdækket i projektets fase 2.

#### *Valg af primærsubstratkoncentration*

På baggrund af resultaterne vist i figur 2.2 samt ovenstående, blev det valgt at benytte substratkoncentrationer på ca. 0,6 mg propan/L og 0,5 mg isobutan/L, i forhold til en optimal omsætningsrate af MTBE samt opretholdelse af mikroorganismernes enzymaktivitet. Der observeredes ved disse substratkoncentrationer MTBE-nedbrydningsrater på 10,1 og 15,7 mg MTBE/(g protein·time) for hhv. den propan- og den isobutanoxide-

rende kultur, jf. tabel D.1 i bilag D. Begge rater er observeret ved 23°C og en initialkoncentration af MTBE på ca. 10 mg MTBE/L.

### **2.3 Nedbrydningskinetik for primærsubstrat**

#### *Forbrug af primærsubstrat*

Da en given bioreaktor i princippet kan køres ved forskellige primærsubstratkoncentrationer og da omsætningshastigheden, og dermed den nødvendige tilsætning, for primærsubstratet afhænger af koncentrationsniveauet, blev der udført forsøg til bestemmelse af nedbrydningskinetik for primærsubstraterne propan og isobutan.



### Michaelis-Menten

Nedbrydningskinetikken for substraterne kan beskrives vha. Michaelis-Menten relationen, ligning 2.1:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (2.1)$$

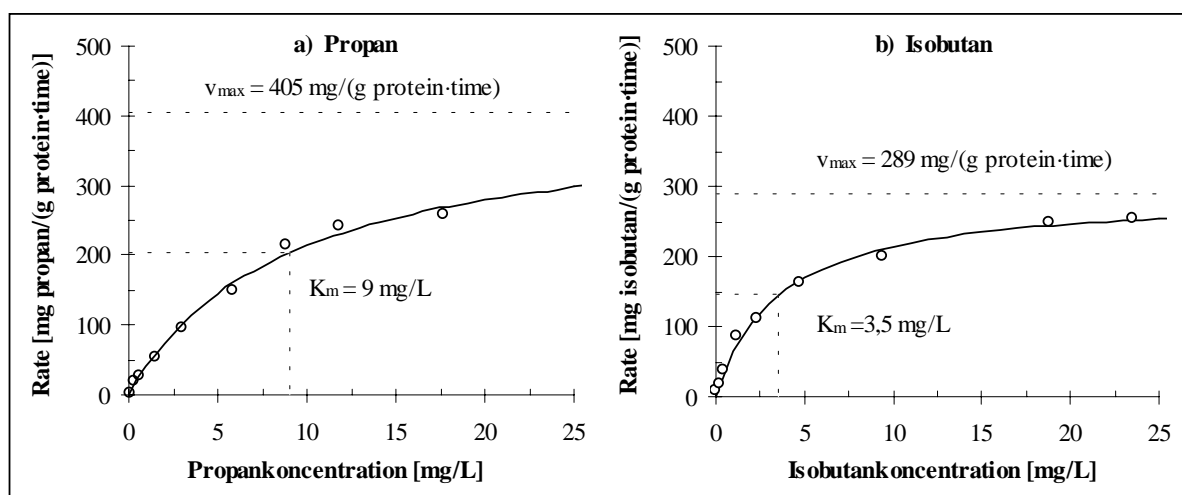
hvor  $S$  er substratkoncentrationen [mg substrat/L],  $v$  er den aktuelle substratomsætningshastighed [mg substrat/(g protein·time)],  $v_{\max}$  er den maksimale omsætningshastighed [mg substrat/(g protein·time)] og  $K_m$  er halvmætningskonstanten [mg substrat/L], dvs. den substratkoncentration, hvor der opnås  $0,5 \cdot v_{\max}$ .

### Fremgangsmåde

Substratomsætningsraten blev bestemt ved 11 propankoncentrationer og ved 9 isobutankoncentrationer. Kulturerne blev placeret i serumflasker ved 23°C og substratkoncentrationen blev monitoreret over en periode på ca. 6 timer. Den nærmere fremgangsmåde ved forsøget er beskrevet i bilag A.3.

### Resultater

Nedbrydningsraterne for de to berigelseskulturer ved de forskellige koncentrationer af primærsubstrat fremgår af tabel D.2 i bilag D. Resultaterne fremgår grafisk af figur 2.3, sammen med ligning 2.1 fittet til resultaterne. Raterne ved de to højeste propankoncentrationer (hvor der var størst overtryk i serumflaskerne) er ikke medtaget idet propperne i disse flasker blev konstateret utætte efter gentagne kanylestik. Da der således, udover den biologiske omsætning, er sket en abiotisk substratfjernelse blev de tilsyneladende nedbrydningsrater i disse flasker kunstigt høje.



Figur 2.3: Michaelis-Menten kurver til beskrivelse af omsætningen af propan og isobutan.

Ved fitningen af ligning 2.1 til de opnåede resultater, jf. figur 2.3, beskriver Michaelis-Menten relationerne givet ved ligning 2.2 og 2.3, altså substratomsætningshastigheden som funktion af substratkoncentrationen for hhv. propan og isobutan.

$$v_{propan} = 405 \cdot \frac{S_{propan}}{9 + S_{propan}} \quad (2.2)$$

$$v_{isobutan} = 289 \cdot \frac{S_{isobutan}}{3,5 + S_{isobutan}} \quad (2.3)$$

#### *Substratforbrug*

Ved de benyttede primærsubstratkoncentrationer på hhv. ca. 0,6 mg propan/L og 0,5 mg isobutan/L, jf. afsnit 2.2.2, kan der vha. ligning 2.2 og 2.3 beregnes omsætningshastigheder for primærsubstraterne på hhv. ca. 25,3 og 36,1 mg substrat/(g protein·time). Disse rater er fundet ved 23°C.

## **2.4 Nedbrydningskinetik for MTBE**

#### *Reaktordimensionering*

For at kunne udføre såvel hydraulisk som biologisk dimensionering af en bioreaktor til en given rensningsopgave; herunder for at kunne designe reaktoren, så den kan leve op til givne krav til oprensningsniveau (mg/L i udløb) og rensningsgrad (% massefjernelse), er det nødvendigt at have en god bestemmelse af berigelseskulturens nedbrydningskinetik for MTBE.

#### *Kinetik for den propanoxiderende kultur*

Ved tidligere forsøg udført på Aalborg Universitet, (Heick og Sørensen, 1999), blev der fundet  $v_{max}$  og  $K_m$  værdier for en berigelseskultur af propanoxiderende bakterier på hhv. ca. 43 mg MTBE/(g protein·time) og 142 mg MTBE/L ved ca. 0,6 mg propan/L og 23°C.

#### *Kinetik for den isobutanoxiderende kultur*

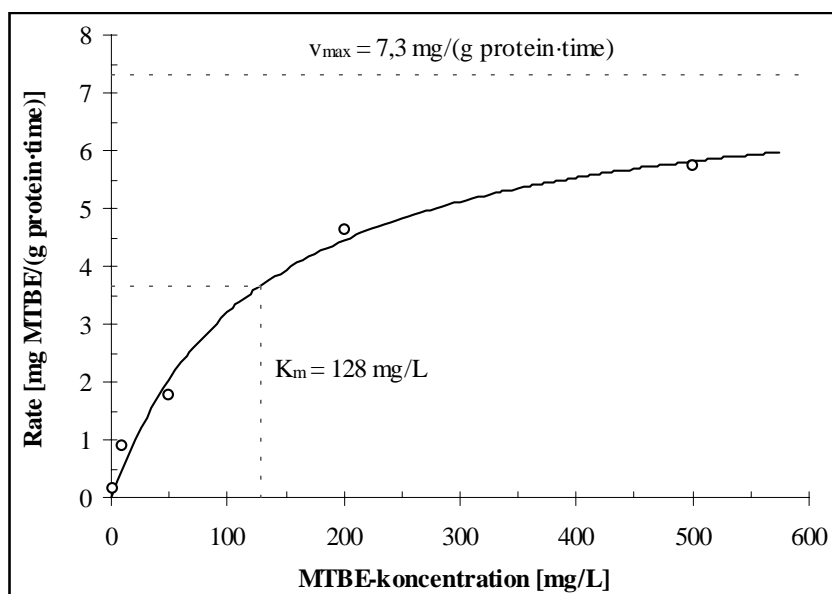
I den første fase af nærværende projekt blev der derfor ikke udført forsøg til bestemmelse af Michaelis-Menten parametrene for den propanoxiderende berigelseskultur, da det blev vurderet mere relevant at opnå parametre for den isobutanberigede kultur, der kunne danne grundlag for en sammenligning af de to kulturer.

#### *Fremgangsmåde*

MTBE-nedbrydningsraten blev bestemt ved fem forskellige MTBE-koncentrationer. Kulturerne blev placeret i serumflasker ved 23°C og MTBE-koncentrationen blev monitoreret over en periode på ca. 1 – 7 døgn. Den nærmere fremgangsmåde ved forsøget er beskrevet i bilag A.4.

#### *Resultater*

Nedbrydningsraterne ved de forskellige koncentrationer af MTBE fremgår af tabel D.3 i bilag D. Resultaterne fremgår grafisk af figur 2.4, sammen med ligning 2.1, fittet til resultaterne.



**Figur 2.4:** Michaelis-Menten kurve for nedbrydning af MTBE vha. den isobutanberigede bakteriekultur.

Som det fremgår af figur 2.4 er der bestemt en halvmætningskonstant,  $K_m$ , på 128 mg MTBE/L og en maksimal MTBE-nedbrydningsrate,  $v_{max}$ , på 7,3 mg MTBE/(g protein·time).

#### *Ikke-idéelle forsøgsbetingelser*

Det bemærkes, at den fundne  $v_{max}$  ligger væsentligt under den i afsnit 2.2.2 bestemte rate. Her blev nedbrydningsraten således bestemt til 15,7 mg MTBE/(g protein·time) ved samme koncentration af isobutan (ca. 0,5 mg/L) og ved 10 mg MTBE/L. Dette forhold tilskrives, at en del af biomassen under automatisk omrystning adsorbere til tørre områder af glasvæggen i forsøgsflaskerne og dermed ikke var i god kontakt med opløsningen. Under den indledende screening blev flaskerne rystet manuelt med jævne mellemrum, hvorved dette problem kunne undgås.

I de følgende beregninger tages der udgangspunkt i den MTBE-nedbrydningsrate på 15,7 mg MTBE/(g protein·time), der blev bestemt under den indledende substratscreening, jf. afsnit 2.2.2.

#### *$K_m$ for den isobutanoxiderende kultur*

Den fundne  $K_m$ -værdi på 128 mg MTBE/L kan antages at være repræsentativ for berigelseskulturen under forudsætning af, at andelen af adsorberet biomasse var ens i de fem forsøgsflasker, der ligger til grund for resultaterne i figur 2.4. Dette skyldes, at  $K_m$ , i modsætning til  $v_{max}$ , er en bakteriespecifik parameter, der ikke afhænger af biomassens absolutte størrelse. Til sammenligning med den fundne  $K_m$ -værdi på 128 mg/L opnåede (Heick og Sørensen, 1999) en  $K_m$ -værdi på 142 mg/L for en berigelseskultur af propanoxiderende bakterier. I litteraturen er der angivet et generelt niveau for  $K_m$  på ca. 80 – 210 mg/L, ved cometabolisk omsætning af MTBE vha. forskellige alkanoxiderende bakterier (f.eks. Hyman et al., 1998; Garnier et al., 1999). Samlet vurderes det således, at den opnåede  $K_m$ -værdi ligger forholdsvis tæt på den "sande"  $K_m$ -værdi for berigelseskulturen.

#### *v<sub>max</sub> for den isobutanoxiderende kultur*

Hvis det antages, at den ovenfor bestemte  $K_m$ -værdi på 128 mg MTBE/L er repræsentativ for den isobutanoxiderende kultur og, hvis MTBE-nedbrydningsraten (ved 10 mg MTBE/L) på 15,7 mg MTBE/(g protein-time), jf. afsnit 2.2.2, benyttes, kan der vha. ligning 2.1 beregnes en  $v_{max}$ -værdi på ca. 217 mg MTBE/(g protein-time).

#### *v<sub>max</sub> for den propanoxiderende kultur*

Hvis det for den propanoxiderende kultur tilsvarende antages, at  $K_m$ -værdien på 142 mg MTBE/L er repræsentativ for kulturen, og hvis MTBE-nedbrydningsraten (ved 10 mg MTBE/L) på 10,1 mg MTBE/(g protein-time), jf. afsnit 2.2.2, benyttes, kan der vha. ligning 2.1 beregnes en  $v_{max}$ -værdi på ca. 152 mg MTBE/(g protein-time).

#### *Kinetik for MTBE-nedbrydning*

På baggrund af ovenstående forudsætninger kan der opstilles Michaelis-Menten relationer til beskrivelse af MTBE-nedbrydningsraten som funktion af MTBE-koncentrationen for hhv. den propan- og den isobutanoxiderende berigelseskultur; ligning 2.4 og 2.5.

$$v_{MTBE} = 152 \cdot \frac{S_{MTBE}}{142 + S_{MTBE}} \quad (2.4)$$

$$v_{MTBE} = 217 \cdot \frac{S_{MTBE}}{128 + S_{MTBE}} \quad (2.5)$$

hvor  $S_{MTBE}$  er MTBE-koncentrationen i væskefasen [mg MTBE/L] og  $v_{MTBE}$  er MTBE-nedbrydningsraten [mg MTBE/(g protein-time)].

Hvis forudsætningerne holder har den isobutanberigede kultur altså ca. 40% højere maksimalt nedbrydningspotentiale for MTBE end den propanberigede kultur.

#### *Yderligere forsøg i projektets 2. fase*

Det foreliggende datagrundlag vurderes dog ikke at være tilstrækkeligt som redskab ved dimensionering af on-site rensningsløsninger, hvorfor forsøget til fastlæggelse af Michaelis-Menten kinetikken for den isobutanoxiderende kultur gentages i projektets fase 2, sammen med et tilsvarende forsøg for den propanoxiderende kultur.

## **2.5 Bestemmelse af maksimale væksthastigheder**

#### *Opretholdelse af ønsket biomassekoncentration*

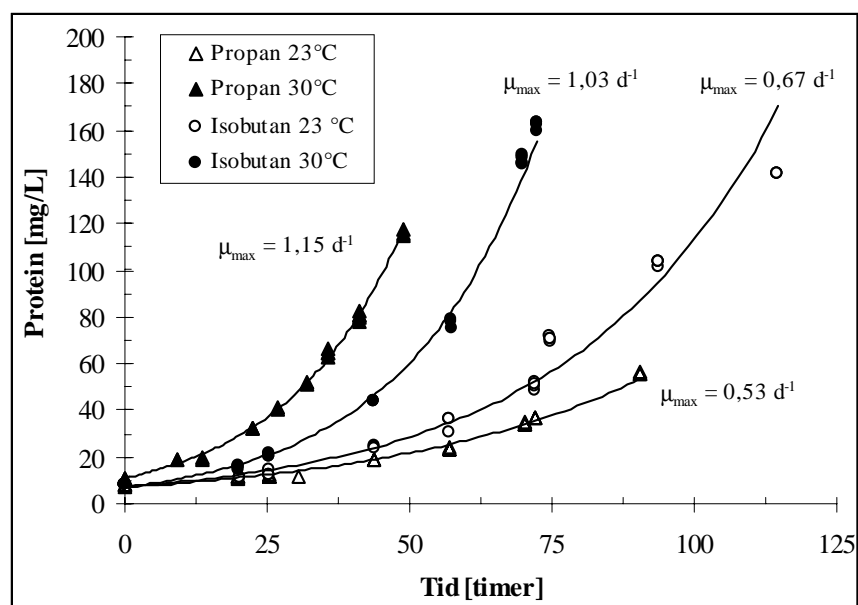
For at afklare om det er realistisk at opretholde en ønsket biomassekoncentration, under drift af en given bioreaktor, ved mikrobiel vækst alene, blev der udført forsøg til bestemmelse af de maksimale væksthastigheder for den propan- og den isobutanoxiderende berigelseskultur. Det er således undersøgt om bakterierne kan vokse hurtigt nok til ikke at blive skyllet ud, eller om der kræves en enhed til tilbageholdelse af biomasse i forbindelse med reaktordriften.

### Fremgangsmåde

Den maksimale specifikke væksthastighed blev for hver af de to berigelseskulturer bestemt ved to forskellige temperaturer (23 og 30°C). Kulturerne blev tilsat substrat og ilt i overskud og biomassekoncentrationen blev monitoreret over en periode på ca. 2 – 5 døgn. Den nærmere fremgangsmåde ved forsøget er beskrevet i bilag A.5.

### Resultater

Biomassekoncentrationerne som funktion af tiden fremgår af tabel D.4 i bilag D. Resultaterne for de udførte forsøg ved hhv. 23 og 30°C er afbildet i figur 2.5.



**Figur 2.5:** Vækstkurver for propan- og isobutanoxiderende berigelseskulturer ved 23 og 30°C.

### Vækstrater

Som det fremgår af figur 2.5 er der fundet vækstrater for de to berigelseskulturer på ca. 0,5 – 1,2 d<sup>-1</sup> ved 23 – 30°C. Disse rater ligger umiddelbart i den lave ende af det der i litteraturen er rapporteret for alkanoxiderende bakterier, men i den høje ende af værdier rapporteret for bakterier, der gror udelukkende på MTBE. Typiske vækstrater for alkanoxiderende bakterier ved 20 – 30°C ligger således i intervallet 1,1 – 4,6 d<sup>-1</sup> (Heick og Sørensen, 1999; Garnier et al., 1999), mens vækstrater for rene MTBE-nedbrydere tilsvarende ligger i intervallet <0,01 – 1,45 d<sup>-1</sup> (Salanitro et al., 1994; Park og Cowan, 1997).

### Hydraulisk opholdstid; tilbageholdelse af biomasse påkrævet

Hvis biomassekoncentrationen i en reaktor skal kunne opretholdes ved vækst alene kan det, på baggrund af de observerede vækstrater, konkluderes, at der kræves hydrauliske opholdstider på mindst 20 timer. Dette er vel at mærke ved 30°C og høje substratkoncentrationer, der ikke er ønskelige i forhold til en effektiv MTBE-nedbrydning, jf. figur 2.2. Væksten ved 10°C må endvidere forventes at være ca. 4 – 10 gange

mindre end ved 30°C, hvorved de påkrævede hydrauliske opholdstider tilsvarende vil blive 4 – 10 gange større. En afværgepumpning på 1 m<sup>3</sup>/time ville således skulle matches af en reaktor på minimum 80 m<sup>3</sup>, hvilket vurderes at være urealistisk i forhold til on-site anvendelse af teknologien. Det er således nødvendigt med en form for tilbageholdelse af biomassen i den kontinuerte bioreaktor, f.eks. ved membranfiltrering og recirkulation, som angivet af (Pitre og Steffan, 1997).

# 3 Perspektiver for on-site rensning af grundvand

## *Overlagsmæssig dimensionering*

På baggrund af de opnåede laboratorieresultater vil der i det følgende blive udført indledende overlagsberegninger for dimensionering af en on-site bioreaktor til fjernelse af MTBE. Beregningerne skal udelukkende benyttes til indledende diskussion af de tekniske perspektiver for etablering af on-site biofiltre baseret på cometabolisk nedbrydning og ikke som nogen endelig dimensioneringsvejledning.

## *Overordnede forbehold*

Der er i beregningerne ikke taget hensyn til en eventuel tilstedeværelse af øvrige forureningskomponenter, f.eks. BTEX'er, der evt. kan medføre yderligere iltforbrug og/eller hæmning af MTBE-nedbrydningen. Der er ligeledes set bort fra den mulige betydning af grundvandets kemiske beskaffenhed, ligesom forhold omkring substrat- og ilttilsætning kun er diskuteret på et overordnet plan. En række af disse problemstillinger vil blive undersøgt nærmere i projektets anden fase.

## 3.1 Korrektion for temperatur og biomassekoncentration

### *Temperaturkorrektion*

Idet nedbrydningsraterne for substrater og MTBE er bestemt ved 23°C skal disse korrigeres til en temperatur, der anses for at være realistisk i forbindelse med praktisk drift af en on-site reaktor. Nedbrydningsraterne kan temperaturkorrigeres vha. en relation baseret på  $Q_{10}$  (Helweg, 1988):

$$v_{T2} = v_{T1} \cdot Q_{10}^{\frac{T2-T1}{10}} \quad (3.1)$$

hvor  $T1$  er temperaturen, hvor nedbrydningsraten er målt [°C],  $T2$  er den temperatur, som raten ønskes korrigeret til [°C],  $v_{T1}$  er nedbrydningsraten svarende til  $T1$  [mg/(g protein·time)],  $v_{T2}$  er nedbrydningsraten svarende til  $T2$  [mg/(g protein·time)],  $Q_{10}$  er en korrektionsfaktor, der angiver hvor mange gange raten mindskes, hvis temperaturen sænkes 10°C.

### *Drift ved 10°C*

I det følgende antages det, at driften af en given on-site reaktor vil ske ved en temperatur på 10°C ( $T2$ ), svarende ca. til grundvandstemperaturen under dansk forhold. For nedbrydning af miljøfremmede stoffer i jord og grundvand observeres typisk  $Q_{10}$ -værdier i intervallet 2 – 4 (Helweg, 1988). I det følgende antages en  $Q_{10}$ -værdi på 3 at være gældende. I projektets anden fase udføres der bl.a. supplerende batchforsøg til fastlæggelse af nedbrydningsrater ved 10°C, der kan benyttes til fastlæggelse af  $Q_{10}$ -værdier for de aktuelle berigelseskulturer.

### *Biomassekorrektion*

Da de fundne nedbrydningsrater endvidere er normeret til biomassekoncentrationen, udtrykt ved koncentrationen af celleprotein, må der ved disse overslagsberegninger antages en biomassekoncentration for en given on-site reaktor.

### *10 g protein/L*

I (Pitre og Steffan, 1997), hvor der blev opstillet en pilot-skala bioreaktor til cometabolisk rensning af MTBE-forurenet grundvand, blev der under testperioden opnået en biomassekoncentration svarende til ca. 2 g protein/L. (Pitre og Steffan, 1997) vurderer, at der ved optimeret reaktordrift, incl. ultrafiltrering og recirkulation, kan opnås en biomassekoncentration svarende til ca. 10 - 15 g protein/L. I de følgende beregninger antages der en biomassekoncentration på 10 g protein/L, svarende til en optimeret bioreaktor med ultrafiltrering og recirkulation til tilbageholdelse af biomasse. I projektets anden fase udføres der bl.a. reaktorforsøg med tilbageholdelse og recirkulation af biomasse, der kan give en indikation af hvilke biomassekoncentrationer, der potentielt kan opnås.

## **3.2 Korrigerede nedbrydningsrater**

### *MTBE-nedbrydning ved 10°C og 10 mg/L*

Med hensyn til omsætningsraten for MTBE, observeredes der nedbrydningsrater på hhv. 10,1 og 15,7 mg MTBE/(g protein·time), ved primærsubstratkoncentrationer på hhv. ca. 0,6 mg propan/L og 0,5 mg isobutan/L, jf. afsnit 2.2.2. Disse rater er bestemt ved en temperatur på 23°C og en MTBE-koncentration på 10 mg MTBE/L. Hvis raterne korrigeres til 10°C for en optimeret bioreaktor med 10 g protein/L, beregnes rater på hhv. 24 og 38 g MTBE/(m<sup>3</sup> reaktor·time) for de propan- og isobutanberigede kulturer, ved 10 mg MTBE/L.

### *Ideelt opblandet reaktor*

Hvis bioreaktoren, pga. mekanisk omrøring, regnes ideelt opblandet, vil MTBE-koncentrationen i udløbet svare til koncentrationen i reaktoren, og dermed til driftspunktet på Michaelis-Menten kurven for MTBE-nedbrydning. Hvis der således ønskes en MTBE-koncentration på f.eks. 1 mg MTBE/L i udløbet skal de ovenfor beregnede MTBE-nedbrydningsrater korrigeres til denne MTBE-koncentration.

### *MTBE-nedbrydning ved 10°C og 1 mg/L*

I det følgende antages ligning 2.4 og 2.5, afsnit 2.4, at være gældende til beskrivelse af MTBE-nedbrydningsratens afhængighed af MTBE-koncentrationen (ved 23°C). Hvis nedbrydningsraterne korrigeres til 10°C for en optimeret bioreaktor med 10 g protein/L, kan der beregnes MTBE-nedbrydningsrater på hhv. ca. 2,5 og 4 g MTBE/(m<sup>3</sup> reaktor·time) ved 10°C og 1 mg MTBE/L i udløbet.

### *Substratforbrug ved 10°C*

For primærsubstraterne, observeredes der, ved 23°C og koncentrationer på hhv. ca. 0,6 mg propan/L og 0,5 mg isobutan/L, nedbrydningsrater på ca. 25,3 mg propan/(g protein·time) og 36,1 mg isobutan/(g protein·time), jf. afsnit 2.3. Hvis raterne korrigeres til 10°C for en optimeret bioreaktor



med 10 g protein/L, beregnes vha. ligning 2.5 rater på hhv. ca. 60 og 85 g substrat/(m<sup>3</sup> reaktor·time) for de propan- og isobutanberigede kulturer.

### 3.3 Overslagsberegninger

#### *Hydraulisk belastning og massefjernelse*

I de følgende beregninger dimensioneres en hypotetisk bioreaktor til en hydraulisk belastning på 2 m<sup>3</sup>/time og 90% massefjernelse for MTBE. Der tages udgangspunkt i den isobutanberigede kultur og der ses på to forskellige scenarier; ét hvor der fra 100 mg MTBE/L i indløbet renses ned til 10 mg MTBE/L og ét hvor der renses fra 10 til 1 mg MTBE/L.

#### *Dimensionering:*

##### *100 til 10 mg MTBE/L*

I det første tilfælde skal der fjernes 180 g MTBE/time. Da nedbrydningsraten for den optimerede bioreaktor er ca. 38 g MTBE/(m<sup>3</sup> reaktor-time) bliver det nødvendige reaktorvolumen ca. 4,7 m<sup>3</sup>. Ved denne driftssituation skal der tilsættes ca. 400 g isobutan, svarende til ca. 2,2 g isobutan pr. g MTBE, der fjernes. Den hydrauliske opholdstid bliver ca. 2 timer og 20 min.

#### *Dimensionering:*

##### *10 til 1 mg MTBE/L*

I det andet tilfælde skal der fjernes 18 g MTBE/time. Da nedbrydningsraten under disse forhold er ca. 4 g MTBE/(m<sup>3</sup> reaktor-time) bliver det nødvendige reaktorvolumen ca. 4,5 m<sup>3</sup>. Ved denne driftssituation skal der tilsættes ca. 380 g isobutan, svarende til ca. 21 g isobutan pr. g MTBE, der fjernes. Den hydrauliske opholdstid bliver ca. 2 timer og 15 min.

#### *Dimensionering:*

##### *Propanoxiderende bakterier*

Tilsvarende beregninger kan foretages for den propanberigede kultur, hvorved der opnås nødvendige reaktorvolumener på hhv. 7,5 og 7,0 m<sup>3</sup> og substratforbrug på hhv. ca. 2,6 og 25 g propan/g MTBE, der fjernes. De hydrauliske opholdstider bliver hhv. 3 timer og 45 min, og 3 timer og 30 min.

#### *Ilt- og substratbehov*

Det bør bemærkes, at ovenstående overslagsberegninger er udført under forudsætning af, at bakterierne har ideelle betingelser mht. ilt- og substrattilførsel. Det støkiometriske iltforbrug ved oxidation af propan- og isobutan er hhv. 1,2 og 0,9 g O<sub>2</sub>/g substrat, hvilket for ovenstående scenarier vil medføre iltbehov på ca. 180 – 280 g O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> vand, der behandles. Da der samtidig skal tilføres 190 – 240 g substrat/m<sup>3</sup> vand, skal der altså overføres betydelige gasmængder til væskefasen, hvorved masseoverførsel og stripping af forureningskomponenter kan vise sig, at blive væsentlige aspekter ved dimensionering af et givent on-site biofilter.

#### *Mulig faktor 10 reduktion af ilt- og substrattilsætning*

Som anført i afsnit 2.2.2 er der mulighed for, at stort set samme MTBE-nedbrydningsrater, som skitseret i de ovenstående beregninger, kan opretholdes med substratkoncentrationer der er ca. en faktor 10 lavere end de umiddelbart anvendte; med en tilsvarende reduktion af den nødvendige ilttilsætning til følge. Disse forhold vil blive søgt nærmere afdækket under indkøringen af en laboratorieskala bioreaktor i projektets 2. fase.



## 4 Sammenfatning

### *Opformering af berigelseskultur på propan*

Det kan på nuværende tidspunkt konkluderes, at det har været muligt at stimulere og opformere berigelseskulturer med potentiale til cometabolisk nedbrydning af MTBE. Der er således opformet to berigelseskulturer af propanoxiderende mikroorganismer ved berigelse af sphagnumholdig havejord med 1) propan alene og 2) propan og MTBE. Ved screening af MTBE-nedbrydningen for de to berigelseskulturer viste det sig, at nedbrydningspotentialet var ca. 2 – 7 gange så stort for kulturen beriget med både propan og MTBE, som for kulturen beriget med propan alene.

### *Opformering af berigelseskulturer på isobutan og isopentan*

På baggrund af et amerikansk studie blev der iværksat en yderligere selektion for mikroorganismer med potentiale til MTBE-nedbrydning ud fra den propanoxiderende berigelseskultur; dels ved berigelse med af isobutan og dels ved berigelse med isopentan. For disse kulturer blev der opnået MTBE-nedbrydningsrater, der var op mod hhv. 75 og 400% højere end for den propanoxiderende berigelseskultur, med de højeste rater opnået for kulturen beriget med isopentan. Desværre viste isopentan sig, at være svært at håndtere samt, at opløse de teflonbelagte gummipropper, der blev benyttet til forsøgene. Isopentan blev derfor af praktiske årsager fravalgt som muligt primærsubstrat.

### *Nedbrydningsrater for MTBE*

På baggrund af substratscreeningen anbefales det umiddelbart, for de propan- og isobutanoxiderende berigelseskulturer, at benytte substratkoncentrationer på hhv. ca. 0,6 mg propan/L og 0,5 mg isobutan/L. Ved disse koncentrationer blev der observeret MTBE-nedbrydningsrater, svarende til hhv. 24 og 38 g MTBE/(m<sup>3</sup> reaktor-time), for en optimeret reaktor med 10 g protein/L, ved 10 mg MTBE/L og 10°C.

### *K<sub>m</sub>-værdier for MTBE-nedbrydning*

Der er indledende fundet halvmætningskonstanter, K<sub>m</sub>, for MTBE-nedbrydning ved hhv. ca. 0,5 mg isobutan/L og 0,6 mg propan/L på ca. 130 – 150 mg MTBE/L. Disse K<sub>m</sub>-værdier vil blive forsøgt bedre fastlagt i projektets fase 2.

### *Kinetik for omsætning af primærsubstrat*

Der er, for omsætningen af propan, fundet v<sub>max</sub>- og K<sub>m</sub>-værdier på hhv. 405 mg propan/(g protein-time) og 9 mg propan/L. For isobutan er der tilsvarende fundet v<sub>max</sub>- og K<sub>m</sub>-værdier på hhv. 289 mg isobutan/(g protein-time) og 3,5 mg isobutan/L. Ved koncentrationer på hhv. ca. 0,6 mg propan/L og 0,5 mg isobutan/L kan der således beregnes omsætnings-hastigheder på hhv. 60 og 85 g substrat/(m<sup>3</sup> reaktor-time), for en optimeret reaktor med ca. 10 g protein/L ved 10°C.

### *Mikrobielle væksthastigheder*

Ved forsøg udført ved 23 og 30°C og med høje substratkoncentrationer, er der fundet maksimale væksthastigheder på mellem 0,5 og 1,2 d<sup>-1</sup>. På

denne baggrund vurderes det, at mikroorganismernes væksthastigheder ikke er tilstrækkelige til at sikre opretholdelse af biomassekoncentrationen i en given on-site reaktor ved vækst alene. I tilknytning til en on-site reaktor skal der således etableres en enhed til tilbageholdelse af biomasse.

#### *Perspektiver for on-site reaktor*

Ved en indledende dimensionering af en on-site bioreaktor, baseret på de opnåede resultater for den isobutanberigede kultur, kan der f.eks. ved 90% massefjernelse for MTBE samt en hydraulisk belastning på 2 m<sup>3</sup>/time beregnes et nødvendigt reaktorvolumen på hhv. 4,7 og 4,5 m<sup>3</sup>, afhængigt af om der skal renses fra 100 til 10 mg MTBE/L eller fra 10 til 1 mg MTBE/L. Der kan i disse to tilfælde beregnes et forbrug af primærsubstrat på hhv. ca. 2,2 og 21 g isobutan/g MTBE.

#### *Forbehold ved opskalering*

Ovenstående beregninger er udført som simple overslagsberegninger ud fra de opnåede laboratorieresultater; dvs. under forudsætning af, at der kan opretholdes ideelle betingelser mht. ilt- og substrat for al biomasse i en given on-site reaktor. Der kan dog vise sig, at være væsentlige praktiske problemer med tilførsel af tilstrækkelige mængder ilt og substrat samt evt. stripping af forureningskomponenter ved opskalering fra laboratorieskala til pilot-/on-site skala. Disse forhold vil blive søgt nærmere afdækket i projektets 2. fase.

#### *Potentiale for on-site rensning*

Samlet vurderes det at være dokumenteret, at der forholdsvist simpelt kan fremelskes berigelseskulturer, med et væsentligt potentiale til nedbrydning af MTBE samt at være sandsynliggjort, at disse kulturer har potentiale til massefjernelse i forbindelse med on-site rensning af MTBE-forurenede grundvand i en kontinuert bioreaktor.

## 5 Referencer

*Arvin og Broholm (2001)*

Arvin, E. og K. Broholm (2001). Effektivitet af on-site teknikker til oprensning af MTBE forurenede grundvand. ATV-møde: Vintermøde om jord- og grundvandsforurening, 6.-7. marts 2001.

*Garnier et al. (1999)*

Garnier, P. M., R. Auria, C. Augur og S. Revah (1999). Cometabolic biodegradation of methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 498-503.

*Heick og Sørensen (1999)*

Heick, O. og S. B. Sørensen (1999). Mikrobiel nedbrydning af MTBE – Propanoxiderende bakterier. Afgangprojekt ved civilingeniøruddannelsen i miljøteknik, Institut for vand, jord og miljøteknik, Aalborg Universitet.

*Helweg (1998)*

Helweg, A. (red.) (1988). Kemiske stoffer i landjords miljøer. Teknisk Forlag A/S.

*Hyman et al. (1998)*

Hyman, M, P. Kwon, K. Williamson og K. O'Reilly (1998). Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms, 321 – 326, (C1-3) af Proceedings of the first international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds, Battelle Press. (Editors) G. B. Wickramanayake og R. E. Hinchee.

*Hyman og O'Reilly (1999)*

Hyman, M, og K. O'Reilly (1999). Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria, 7 - 12. I "In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds", 5(3) af Proceedings of the fifth international in situ and on-site bioremediation symposium, Battelle Press. (Editors) B. C. Alleman og A. Leeson.

*Keller et al. (2000a)*

Keller, A. A., O. C. Sandall, R. G. Rinker, M. M. Mitani, B. Bierwagen, og M. J. Snodgrass (2000a). An evaluation of physicochemical treatment technologies for water contaminated with MTBE. *Groundwater Monitoring and Remediation*, fall 2000, 114-126.

*Keller et al. (2000b)*

Keller, A. A., S. Sirivithiyapakorn, og M. L. Kram (2000b). Remediation of Water and Soil Contaminated with MTBE, 73 - 80. I "Case Studies in the Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds", (C2-7), Proceedings of the second international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds, Battelle Press. (Editors) G. B. Wickramanayake, A. R. Gavaskar, J. T. Gibbs og J. L. Means.

*Miljøstyrelsen (1998)*

Miljøstyrelsen (1998). M. Kjærgaard, J. P. Ringsted, H.-J. Albrechtsen og P. L. Bjerg. Miljøprojekt nr. 408. Naturlig nedbrydning af miljøfremmede stoffer i jord og grundvand.

*Miljøstyrelsen (1999)*

Miljøstyrelsen (1999). E. Arvin og K. Broholm. Miljøprojekt nr. 483. Afværgeteknikker for MTBE-forurenede grundvand.

*Park og Cowan (1997)*

Park, K. og R. M. Cowan (1997). Biodegradation of gasoline oxygenates, 17. I "In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 1", 4(1) af Proceedings of the fourth international in situ and on-site bioremediation symposium, Battelle Press. (Editors) B. C. Alleman og A. Leeson.

*Pitre og Steffan (1997)*

Pitre, M. P. og R. Steffan (1997). Biotreatment of MTBE-contaminated groundwater in membrane bioreactor. AIChE 1997 Spring National Meeting, Envirogen, Inc.

*Salanitro et al. (1994)*

Salanitro, J. P., L. A. Diaz, M. P. Williams og H. L. Wisniewski (1994). Isolation of a bacterial culture that degrades methyl t-butyl ether. Appl. Environ. Microbiol., 60(7), 2593-2596.

*Skøt (1998)*

Skøt, M. (1998). Miljøtruslen der bekymrer enhver. Vand og Jord, 5(3), 105-108.

*Steffan et al. (1997)*

Steffan, R.J., K. McClay, S. Vainberg, C. W. Condee, and D. Zhang (1997). Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol, 63(11), 4216-4222.

*Stub (1998)*

Stub, L. (1998). Status for MTBE. ATV-møde: Olie- og benzingerunde, Schæffergården 7. oktober, 1998, 39-54.

# Bilag A: Laboratorieprocedurer

## A.1: Screening af propanoxiderende kulturer

### *Fremgangsmåde*

Bakteriekulturene i flaske 1 og 2, jf. afsnit 2.1.1, blev centrifugeret ned, tilsat en 120 mL serumflaske og fortyndet med vækstmedie til et volumen på 20 mL. Efter grundig homogenisering blev biomassekoncentrationen målt som optisk densitet ved 550 nm ( $OD_{550}$ ) og omregnet til koncentration af celleprotein vha. standardkurverne præsenteret i bilag C. Serumflaskerne blev herefter lukket med teflonbelagte gummipropper og tilsat 5 mL propangas, svarende til en væskekoncentration på ca. 3,1 mg propan/L, samt en initialkoncentration af MTBE på 10 mg/L.

### *Blindtest*

Der blev udført parallelle blindtest til dokumentation af, at der ikke skete abiotisk fjernelse af MTBE i serumflaskerne (Blind A og B).

### *Temperatur og forsøgsvarighed*

Serumflaskerne blev placeret ved 23°C og MTBE-koncentrationen blev monitoreret ved head-space analyse over en periode på ca. 75 timer.

## A.2: Screening efter yderligere selektion

### *Fremgangsmåde*

Hver bakteriekultur blev centrifugeret ned og fortyndet med vækstmedie til et væskevolumen på 100 mL. Efter grundig homogenisering blev biomassekoncentrationen for hver kultur målt som optisk densitet ved 550 nm ( $OD_{550}$ ) og omregnet til koncentration af celleprotein vha. standardkurverne i bilag C. Herefter blev hver kultur opdelt i fem serumflasker (20 mL i hver) med volumen på 120 mL. Serumflaskerne blev efterfølgende lukket med teflonbelagte gummipropper og tilsat ca. 10 mg MTBE/L.

### *Substratkoncentrationer*

Der blev anvendt fem forskellige niveauer af hvert primærsubstrat, jf. tabel D.1 i bilag D. Propan blev tilsat i koncentrationer fra 0 til 6,3 mg/L, isobutan blev tilsat i koncentrationer fra 0 til 4,9 mg/L og isopentan blev tilsat i koncentrationer fra 0 til 1,06 mg/L.

### *Temperatur og forsøgsvarighed*

Serumflaskerne blev placeret ved 23°C og MTBE-koncentrationen blev monitoreret ved head-space analyse over en periode på ca. 24 timer.



### A.3: Nedbrydningskinetik for primærsubstrat

#### *Fremgangsmåde*

Til disse forsøg blev der anvendt 60 mL serumflasker, indeholdende 40 mL vækstmedie med biomasse. Efter grundig homogenisering blev biomassekoncentrationen målt som optisk densitet ved 550 nm ( $OD_{550}$ ) og omregnet til koncentration af celleprotein vha. standardkurverne præsenteret i bilag C. Serumflaskerne blev herefter lukket med teflonbelagte gummipropper og placeret med omrystning ved 150 rpm.

#### *Substratkoncentrationer*

Der blev anvendt 11 forskellige propankoncentrationer og 9 forskellige isobutankoncentrationer, jf. tabel D.2 i bilag D. Propan blev tilsat i koncentrationer fra 0,06 til 30 mg/L og isobutan blev tilsat i koncentrationer fra 0,048 til 24 mg/L.

#### *Temperatur og forsøgsvarighed*

Serumflaskerne blev placeret ved 23°C og substratkoncentrationen blev monitoreret ved head-space analyse over en periode på ca. 6 timer.

### A.4: Nedbrydningskinetik for MTBE

#### *Fremgangsmåde*

Til disse forsøg blev der anvendt 120 mL serumflasker, indeholdende 20 mL vækstmedie med biomasse. Efter homogenisering blev biomassekoncentrationen målt som optisk densitet ved 550 nm ( $OD_{550}$ ) og omregnet til koncentration af celleprotein vha. standardkurven for den isobutanoxidende kultur i bilag C. Serumflaskerne blev herefter lukket med teflonbelagte gummipropper og der blev injiceret 1 mL isobutan, svarende til en væskefasekoncentration på ca. 0,5 mg isobutan/L, svarende til den i afsnit 2.2.3 foreslåede koncentration af isobutan. Flaskerne blev omrystet ved 150 rpm.

#### *Substratkoncentrationer*

Der blev anvendt fem forskellige MTBE-koncentrationer i intervallet 1 til 500 mg/L, jf. tabel D.3 i bilag D.

#### *Temperatur og forsøgsvarighed*

Serumflaskerne blev placeret ved 23°C og MTBE-koncentrationen blev løbende monitoreret ved head-space analyse over en periode på ca. 1 – 7 døgn, afhængigt af koncentrationsniveauet.

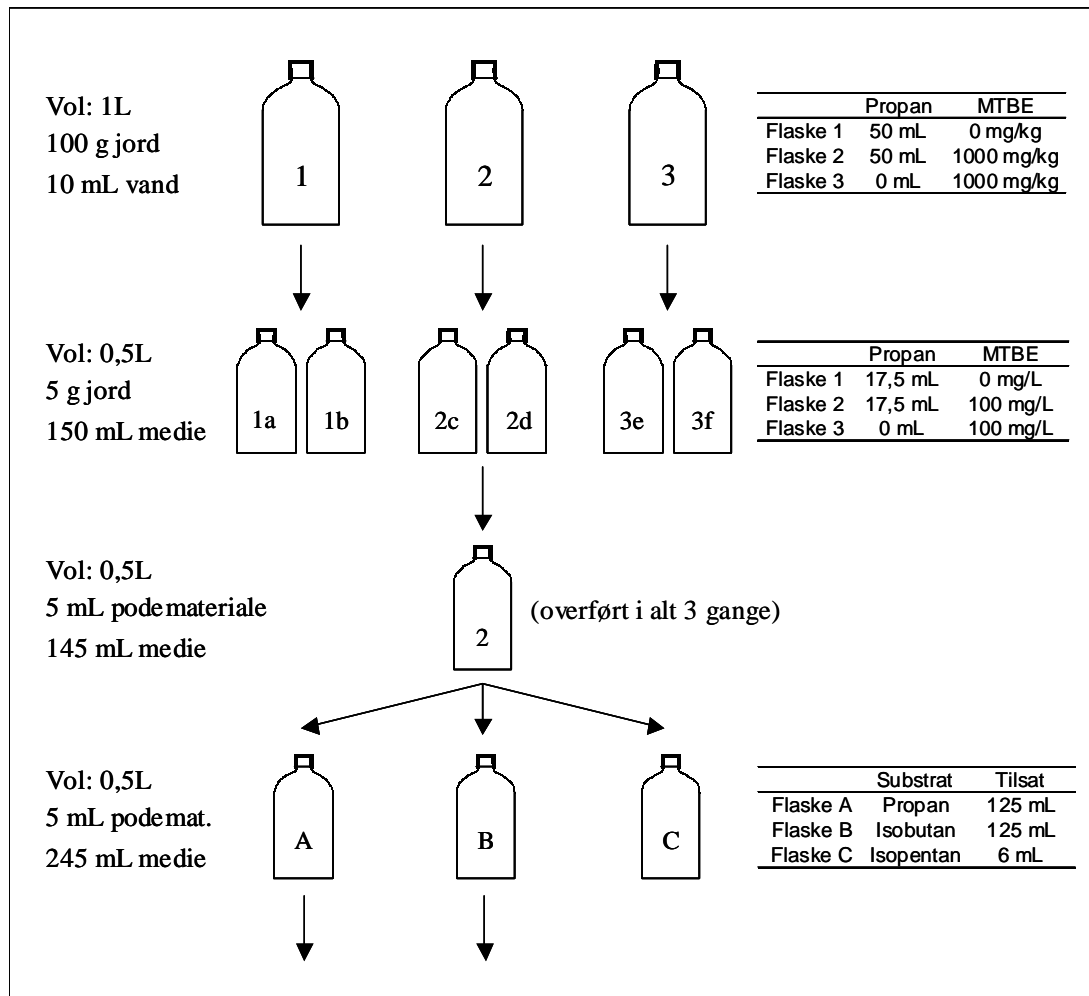
### A.5: Bestemmelse af maksimale vækstrater

#### *Fremgangsmåde*

Til disse forsøg blev der anvendt 1 L flasker, indeholdende en tynd biomassesuspension i 250 mL vækstmedie. Flaskerne blev lukket med teflonbelagte gummipropper og tilsat 375 mL propan hhv. isobutan, svarende til væskefasekoncentrationer på ca. 31 mg propan/L og 24 mg isobutan/L. Hver flaske blev ligeledes tilsat 40 mL ren ilt, svarende til at der, inklusiv atmosfærebidraget, til start var omkring 10 mg  $O_2$ /L i hver flaske. Flaskerne blev omrystet ved 150 rpm. Der blev placeret en flaske

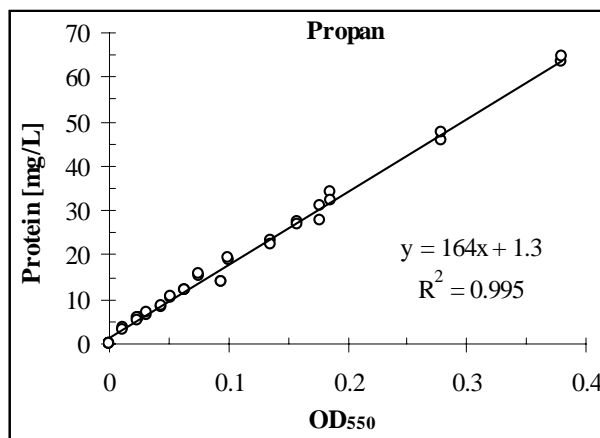
med hver berigelseskultur ved hhv. 23 og 30°C og væksten blev fulgt over ca. 2 – 5 døgn ved, efter grundig omrystning, at udtage en repræsentativ prøvemængde til bestemmelse af OD<sub>550</sub> gennem en gastæt ventil. Prøverne blev ført tilbage til flaskerne efter endt måling. OD<sub>550</sub> er omregnet til koncentration af celleprotein vha. standardkurverne i bilag C.

## Bilag B: Berigelsesprocedure



**Figur B.1:** Skematisk fremstilling af den anvendte berigelsesprocedure.

## Bilag C: Biomasse standardkurver (OD<sub>550</sub> – protein)



*Propanoxiderende berigelseskultur*

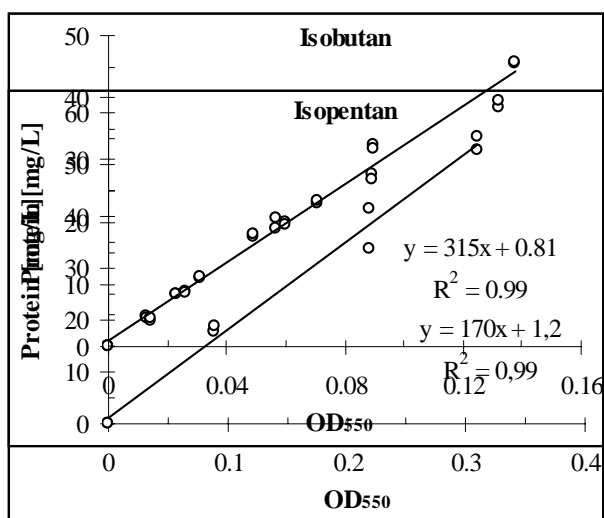
**Figur C.1:** Standardkurve OD<sub>550</sub> - protein.

*Isobutanoxiderende berigelseskultur*

**Figur C.2:** Standardkurve OD<sub>550</sub> - protein.

*Isopentanoxiderende berigelseskultur*

**Figur C.3:** Standardkurve OD<sub>550</sub> - protein.



# Bilag D: Resultater

## D.1: Screening for bedste substrat

*Tabel D.1: Nedbrydningsrater for MTBE ved forskellige koncentrationer af primærsubstrat. Forsøgene er udført ved 23°C over ca. 24 timer med en initialkoncentration af MTBE på 10 mg/L.*

	Flaske	Substratkoncentration [mg/L]	Fjernet [%]	Rate [mg MTBE/(g protein·time)]
Propan	A-1	0	89	15,2
	A-2	0,063	87	9,3
	A-3	0,63	72	10,1
	A-4	3,15	32	4,2
	A-5	6,3	0	0
Isobutan	B-1	0	97	20,3
	B-2	0,049	96	16,4
	B-3	0,49	96	15,7
	B-4	2,45	92	10,8
	B-5	4,9	13	0,6
Isopentan	C-1	0	82	42,8
	C-2	0,053	84	48,2
	C-3	0,26	89	55,8
	C-4	0,53	81	45,0
	C-5	1,06	84	45,1

### *Biomasse*

OD<sub>550</sub> blev målt til 0,315 for de propan- og isobutanoxiderende kulturer og til 0,130 for den isopentanoxiderende kultur. Dette svarer til biomassekonzentrationer på hhv. 53, 100 og 23 mg protein/L.

## D.2: Nedbrydningskinetik for primærsubstrat

**Tabel D.2:** Nedbrydningsrater for propan og isobutan ved forskellige koncentrationer af primærsubstrat. Forsøgene er udført ved 23°C over ca. 6 timer.

	Flaske	OD <sub>550</sub> [-]	Biomasse [mg protein/L]	Substratkonzentration [mg/L]	Fjernet [%]	Rate [mg substrat/(g protein·time)]
Propan	P-1	0,255	43	0,060	66	3,08
	P-2	0,255	43	0,30	87	17,7
	P-3	0,255	43	0,60	94	27,2
	P-4	0,255	43	1,49	62	54,0
	P-5	0,135	23	3,0	49	94,6
	P-6	0,135	23	6,0	25	149
	P-7	0,384	64	9,0	25	242
	P-8	0,135	23	12	83	216
	P-9	0,384	64	18	23	257
	P-10	0,384	64	24	22	483
	P-11	0,135	23	30	17	369
Isobutan	I-1	0,150	48	0,048	100	7,99
	I-2	0,150	48	0,24	100	19,1
	I-3	0,150	48	0,48	86	36,5
	I-4	0,150	48	1,2	74	86,4
	I-5	0,192	61	2,4	45	110
	I-6	0,192	61	4,8	36	163
	I-7	0,192	61	9,5	24	199
	I-8	0,130	42	19	9,6	250
	I-9	0,192	61	24	18	255

## D.3: Nedbrydningskinetik for MTBE

**Tabel D.3:** Nedbrydningsrater for MTBE ved forskellige koncentrationer af MTBE for den isobutanoxiderende berigelseskultur. Forsøgene er udført ved 23°C og med en initialkoncentration af isobutan på ca. 0,5 mg/L.

Flaske	OD <sub>550</sub> [-]	Biomasse [mg protein/L]	MTBE-konzentration [mg/L]	Tid [d]	Fjernet [%]	Rate [mg MTBE/(g protein·time)]
I-a	0,467	148	1	1	54	0,130
I-b	0,467	148	10	1	67	0,882
I-c	0,223	71	50	6	44	1,76
I-d	0,223	71	200	7	21	4,63
I-e	0,499	158	500	6	16	5,72

#### D.4: Bestemmelse af maksimale væksthastigheder

**Tabel D.4:** Rådata fra vækstforsøg til bestemmelse af maksimale vækstrater for propan- og isobutanoxiderende berigelseskulturer.

Propan 23°C			Propan 30°C			Isobutan 23°C			Isobutan 30°C		
Tid	OD <sub>550</sub>	Protein	Tid	OD <sub>550</sub>	Protein	Tid	OD <sub>550</sub>	Protein	Tid	OD <sub>550</sub>	Protein
[time]	[-]	[mg/L]	[time]	[-]	[mg/L]	[time]	[-]	[mg/L]	[time]	[-]	[mg/L]
0,0	0,036	7,2	0,0	0,059	11,0	0,0	0,024	8,4	0,0	0,024	8,4
0,0	0,040	7,9	0,0	0,060	11,2	0,0	0,023	8,0	0,0	0,023	8,0
0,0	0,039	7,7	0,0	0,059	11,0	0,0	0,023	8,0	0,0	0,023	8,0
20,0	0,063	11,6	9,3	0,109	19,2	20,1	0,031	10,6	20,0	0,042	14,0
20,0	0,061	11,3	9,3	0,106	18,7	20,1	0,032	10,9	20,0	0,046	15,3
20,0	0,060	11,2	13,7	0,111	19,5	20,1	0,032	10,9	20,0	0,046	15,3
25,3	0,070	12,8	13,7	0,105	18,6	25,2	0,044	14,7	20,0	0,050	16,5
25,3	0,065	12,0	22,6	0,191	32,7	25,2	0,038	12,8	25,3	0,064	20,9
25,3	0,065	12,0	22,6	0,187	32,0	25,2	0,038	12,8	25,3	0,064	20,9
30,5	0,064	11,8	22,6	0,190	32,5	25,2	0,037	12,4	25,3	0,065	21,3
43,7	0,106	18,7	26,9	0,245	41,6	43,6	0,076	24,7	43,6	0,136	43,6
43,7	0,107	18,9	26,9	0,239	40,6	43,6	0,074	24,1	43,6	0,138	44,2
57,0	0,140	24,3	32,1	0,309	52,1	43,6	0,072	23,5	43,6	0,136	43,6
57,0	0,132	23,0	32,1	0,303	51,1	57,0	0,095	30,7	57,3	0,237	75,4
57,0	0,135	23,5	35,7	0,383	64,2	57,0	0,111	35,7	57,3	0,246	78,2
70,2	0,205	35,0	35,7	0,375	62,9	57,0	0,111	35,7	57,3	0,247	78,5
70,2	0,200	34,2	35,7	0,395	66,2	72,0	0,152	48,6	70,0	0,470	148,7
70,2	0,200	34,2	35,7	0,387	64,9	72,0	0,157	50,2	70,0	0,469	148,4
72,0	0,215	36,6	41,1	0,477	79,7	72,0	0,162	51,8	70,0	0,462	146,2
72,0	0,216	36,8	41,1	0,467	78,0	72,0	0,160	51,2	70,0	0,460	145,6
90,6	0,334	56,2	41,1	0,492	82,1	74,8	0,218	69,4	72,3	0,506	160,0
90,6	0,332	55,8	41,1	0,481	80,3	74,8	0,226	71,9	72,3	0,514	162,5
90,6	0,333	56,0	41,1	0,481	80,3	74,8	0,224	71,3	72,3	0,516	163,2
			48,9	0,709	117,8	74,8	0,222	70,7	72,3	0,517	163,5
			48,9	0,690	114,7	93,9	0,319	101,2			
			48,9	0,695	115,5	93,9	0,327	103,7			
						93,9	0,326	103,4			
						93,9	0,325	103,1			
						114,8	0,448	141,8			
						114,8	0,447	141,5			
						114,8	0,449	142,1			