Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

DNA-sekventering af miljøprøver fra olie- og benzinforurenede lokaliteter

Kvalitativ dokumentation for naturlig nedbrydning i jord og grundvand

Miljøprojekt, nr. 2321

November 2026

Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:
Andreas Houlberg Kristensen, DMR
Nadieh de Jonge, Aalborg Universitet
Jeppe Lund Nielsen, Aalborg Universitet
Poul Larsen, DMR
Christina Voss Ernstsen, Region Midtjylland
Kaspar Rüegg, Region Midtjylland

ISBN: 978-87-7564-171-0

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter indenfor miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

Forord **5**

Sammenfatning **6**

Summary **7**

1.	**Baggrund og formål**	**8**
1.1	Olie- og benzinforurening	8
1.2	Spredning af kulbrinteforureninger	8
1.3	Betydning af biologisk nedbrydning	9
1.4	Styrende parametre for naturlig nedbrydning	10
1.5	Traditionel dokumentation for naturlig nedbrydning	11
1.6	Inddragelse af nedbrydningsrater i dag	11
1.7	DNA-analyser	12
1.8	Formål	12
2.	**DNA-analyse af miljøprøver**	**13**
2.1	Princip for DNA-metoder	13
2.2	DNA-sekventering af miljøprøver	13
2.3	Erfaringer fra forurenede lokaliteter	14
2.4	Sammenligning med andre dokumentationsmetoder	14
3.	**Udførte undersøgelser**	**16**
3.1	Testlokaliteter	16
3.2	Prøvehåndtering	16
3.2.1	Grundvandsprøver til DNA-sekventering	16
3.2.2	Jordprøver til DNA-sekventering	17
3.2.3	pH-bestemmelse	17
3.3	DNA-analyse	17
3.3.1	DNA-ekstraktion	17
3.3.2	Sekventering og databehandling	18
3.4	Beskrivelse af datasæt	18
4.	**Resultater**	**20**
4.1	Indledende dataanalyse	20
4.2	Kulbrinteforurenet grundvand	21
4.2.1	DNA-udbytte og mikrobiel diversitet	21
4.2.2	Sammenhæng mellem forureningsforhold og biomasse	22
4.3	Kulbrinteforurenet jord	25
4.3.1	DNA-udbytte og diversitet	25
4.3.2	Indikatorpopulationer i jord	28
4.4	Perkolat-påvirket grundvand	31
4.4.1	Biomasse og samfundsstruktur	31
4.4.2	Indikatorpopulationer	31
5.	**Konklusion**	**33**

5.1 DNA-sekventering som dokumentationsmetode 33
5.2 Anvendelse ved komplekse forureninger 33
5.3 Mikrobiel diversitet ved kulbrinteforurening 33
5.4 Anbefalet prøvetagningsstrategi 34
5.5 Økonomiske forhold 34

6. Referencer 35

Bilag 1.Eksempel på DNA-analyserapport 39

Forord

Rapporten omhandler DNA-sekventering af jord- og grundvandsprøver på forurenede lokaliteter. Metoden kan bruges som kvalitativ dokumentation for naturlig biologisk nedbrydning, der kan have afgørende betydning for udbredelsen af forurening med olie- og benzinprodukter (kulbrinter).

Arbejdet har omfattet indsamling af jord- og grundvandsprøver fra forskellige typer sager og geologiske forhold samt efterfølgende DNA-analyse og databehandling.

Rapporten henvender sig til myndighedspersoner og rådgivere, som håndterer og risikovurderer forureninger med kulbrinter.

Projektet er gennemført fra 2021 til 2025 af Dansk Miljørådgivning A/S (DMR) i samarbejde med Aalborg Universitet, Center for Mikrobielle Systemer. De fleste af testlokaliteterne er stillet til rådighed af Region Midtjylland, der også har bidraget med faglig sparring under afrapporteringen.

Sammenfatning

Forurening med olie- og benzinprodukter har typisk en begrænset udbredelse i jord og grundvand. Det skyldes især, at stofferne nedbrydes biologisk af naturlige mikroorganismer. Naturlig nedbrydning kan dokumenteres kvalitativt med DNA-sekventering af jord- og grundvandsprøver.

Dette projekt har haft til formål at udvide erfaringsgrundlaget for DNA-sekventering med udgangspunkt i jord- og grundvandsprøver fra testlokaliteter forurenet med kulbrinter. Desuden er metoden testet på en perkolatforurenet lokalitet med en mere kompleks forureningssammensætning. Arbejdet omfattede i alt 118 jordprøver og 100 grundvandsprøver udtaget på 10 forskellige lokaliteter.

Korrelationsanalyser af resultaterne viste signifikante sammenhænge mellem forureningsgrad og bakteriesammensætning i både jord- og grundvandsprøver. Der blev identificeret både positive og negative indikatorpopulationer, som kan indikere omfanget af naturlig nedbrydning. Flere af de positive indikatorer omfatter taxa kendt fra litteraturen for deres rolle i omsætning af organiske forureninger.

Projektet viser, at sammensætningen af mikroorganismer kan anvendes som kvalitativ dokumentation for biologisk aktivitet, og som støtteparameter ved vurdering af naturlig biologisk nedbrydning af kulbrinter. DNA-analyser kan ikke anvendes til kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsrater, men kan understøtte anvendelse af konservative rater i modelberegninger i f.eks. JAGG eller GrundRisk.

Resultater af DNA-analyser kan dog ikke stå alene og skal indgå i den samlede konceptuelle model, der på grundvandssager typisk også vil omfatte geologi, jordfysiske transportparametre, strømningsforhold, potentialeforhold, aktuel forureningsudbredelse, sorption og redoxforhold. Når den konceptuelle forståelse er etableret, kan resultater fra DNA-analyserne indgå i en vurdering af f.eks. spredningspotentiale, fanestabilitet og udvikling af kildestyrken.

Resultater fra perkolat påvirket grundvand viste, at mikrobiomsammensætningen her i højere grad var styret af geokemiske og hydrogeologiske forhold end af de enkelte forureningsstoffer, f.eks. PFAS. Der kunne ikke påvises entydige mikrobielle responser relateret til PFAS, hvilket er konsistent med den stofgruppes persistente karakter og begrænsede biologiske nedbrydelighed i grundvandet. Desuden var indholdene af PFAS i grundvandet relativt lave, hvilket vurderes at have spillet en rolle.

DNA-analyser vurderes derfor primært at være egnet ved forureninger med bionedbrydelige organiske stoffer som f.eks. olie- og benzinstoffer.

DNA-analyser kan gennemføres på prøver udtaget i forbindelse med almindelige forureningsundersøgelser. DNA-sekventering af en enkelt prøve fra jord eller grundvand er principielt tilstrækkeligt til at vurdere, om der er foregået biologisk nedbrydning af kulbrinter. For robust dokumentation anbefales dog typisk 10–20 prøver pr. lokalitet inden for samme matrice. Desuden bør der inddrages referenceprøver uden forurening for at etablere lokal baggrundsvariation.

Summary

Contamination involving petroleum and gasoline products typically has a limited extent in soil and groundwater. This is primarily due to biodegradation of these compounds by naturally occurring microorganisms. Natural attenuation can be documented qualitatively through DNA sequencing of soil and groundwater samples.

The objective of this project was to expand the knowledge base for DNA sequencing using soil and groundwater samples collected from test sites contaminated with hydrocarbons. In addition, the method was evaluated at a leachate-impacted site characterized by a more complex contamination profile. The study comprised a total of 118 soil samples and 100 groundwater samples collected from 10 different sites.

Correlation analyses of the results demonstrated significant relationships between the degree of contamination and bacterial community composition in both soil and groundwater samples. Both positive and negative indicator populations were identified, which may serve as indicators of the extent of natural attenuation. Several of the positive indicators include taxa that are well documented in the scientific literature for their role in the degradation of organic contaminants. The composition of microbial communities can therefore be used as qualitative evidence of biological activity and as a supporting parameter in the assessment of the natural biodegradation of hydrocarbons. DNA analyses cannot be used to quantify degradation rates; however, they can support the application of conservative degradation rates in Danish predictive modelling tools such as JAGG or GrundRisk.

The results of DNA analyses should not be considered in isolation but must form part of the overall conceptual site model. For groundwater contamination cases, this model will typically also include geology, soil physical transport parameters, groundwater flow conditions, hydraulic potential conditions, the current extent of contamination, sorption processes, and redox conditions. Once a sound conceptual understanding has been established, DNA analysis results can contribute to assessments of factors such as contaminant migration potential, plume stability, and source strength development.

Results from leachate-impacted groundwater showed that microbial community composition was influenced to a greater extent by geochemical and hydrogeological conditions than by individual contaminants, such as PFAS. No unambiguous microbial responses related to PFAS were identified, which is consistent with the persistent nature of this group of compounds and their limited biodegradability in groundwater. In addition, PFAS concentrations in the groundwater were relatively low, which is considered to have contributed to this outcome.

DNA analyses are therefore considered primarily suitable for contamination involving biodegradable organic compounds, such as petroleum hydrocarbons and gasoline-related contaminants.

DNA analyses can be performed on samples collected as part of standard site investigation programmes. In principle, DNA sequencing of a single soil or groundwater sample is sufficient to assess whether biological degradation of hydrocarbons has occurred. However, for robust documentation, 10–20 samples per site within the same environmental matrix are typically recommended. Furthermore, uncontaminated reference samples should be included to establish the local background variation.

1. Baggrund og formål

1.1 Olie- og benzinforurening

Olie- og benzinprodukter er raffineret råolie, der er tilsat additiver for at opnå de ønskede tekniske egenskaber. Produkterne består overvejende af alifatiske kulbrinter, som typisk udgør mere end 70%, mens den resterende andel hovedsageligt er aromatiske og polyaromatiske kulbrinter /Miljøstyrelsen, 2008/. Olie- og benzinstoffer samles ofte under betegnelsen "kulbrinter", da de primært består af kulstof- og hydrogenatomer.

På trods af den igangværende omstilling væk fra fossile brændsler, er kulbrinter stadig den hyppigste årsag til jordforurening i Danmark. Udover brændstof og brændsel indgår kulbrinter i en bred vifte af produkter som f.eks. opløsningsmidler, smøremidler, hydraulikolier, motorolier, tjære og byggematerialer.

Kulbrinteforureninger er ofte gamle spild, der er omfattet af regionernes indsats. Kulbrinter spiller derfor stadig en stor rolle ved regionernes kortlægning, prioritering og afværge af forurening. Derudover er kulbrinter den hyppigste forureningstype på påbudssager med nyere spild fra utætte olietanke og rørføringer samt spild fra landbrugsmaskiner og trafikuheld mv.

1.2 Spredning af kulbrinteforureninger

I modsætning til persistente miljøfremmede stoffer som f.eks. PFAS og flere pesticider, medfører kulbrinteforureninger sjældent lukning af drikkevandsboringer /Danske Regioner, 2023/.

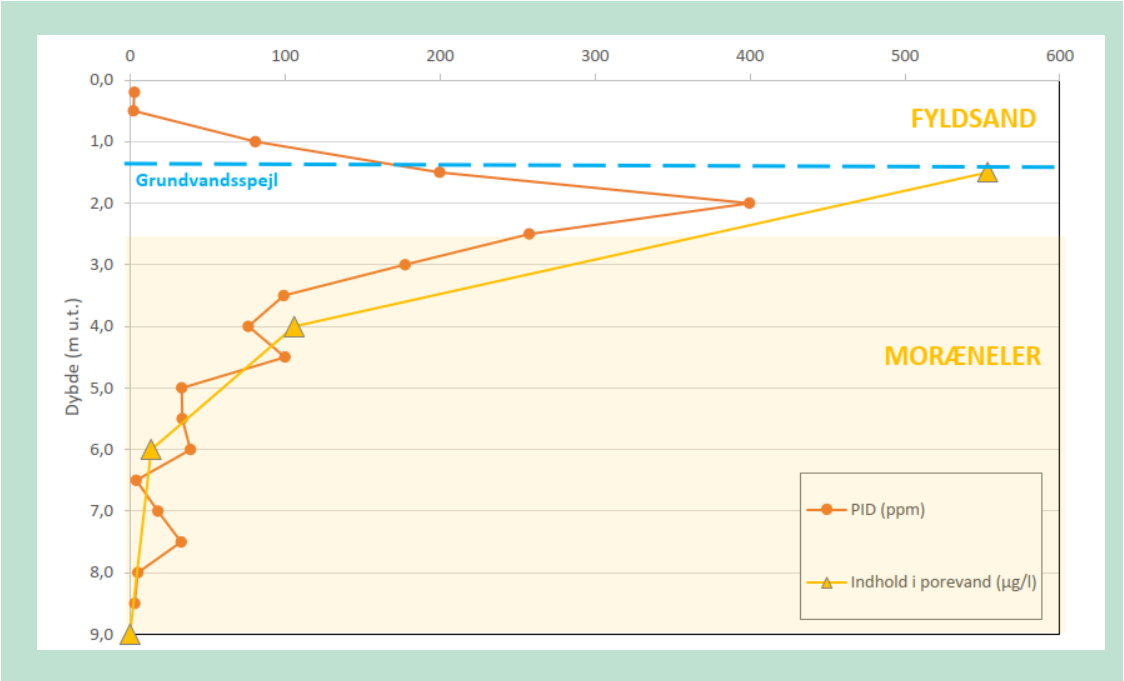
Fere erfaringsopsamlinger og konkrete forureningssager har vist, at forurening med fyrings- og dieselolie i terrænnært grundvand typisk medfører faneudbredelser under 50 m, selv ved kraftige forureninger, hvor der er fri fase (LNAPL) /Miljøstyrelsen, 2009a; Kristensen et al., 2013; Miljøstyrelsen, 2014a/. Figur 1 viser et eksempel fra en sag med spild af ca. 3.000 liter fyringsolie.



FIGUR 1. Eksempel på grundvandsfane på lokalitet med gammel fyringsolieforurening med fri fase i kildeområdet og indhold af kulbrinter i jorden >13.000 mg/kg TS. Ved en undersøgelse

udført 15 år efter spildet var fanen stabiliseret med en længde på 40-50 m fra spildstedet. På dette tidspunkt var der ikke foretaget oprensning af forureningen.

Andre undersøgelser har vist, at opløst olieforurening typisk har en udbredelse ned i lerlag på kun 2-4 m /Miljøstyrelsen, 2021a/ (figur 2). Det stemmer overens med, at olieforureninger sjældent påvises i dybtliggende grundvandsmagasiner /Miljøstyrelsen, 2009a/.



FIGUR 2. Eksempel på vertikal udbredelse kulbrinteforurening (dieselolie og lidt benzin) ned i et lag af moræneler. Kildestyrkekoncentrationen for totalindhold af kulbrinter var 4.200 mg/kg TS i dybden 2 m u.t.. Udbredelsen er vist som PID-udslag på udtagne jordprøver samt porevandkoncentrationer målt i porevand udtaget fra sugeceller /Miljøstyrelsen, 2021a/.

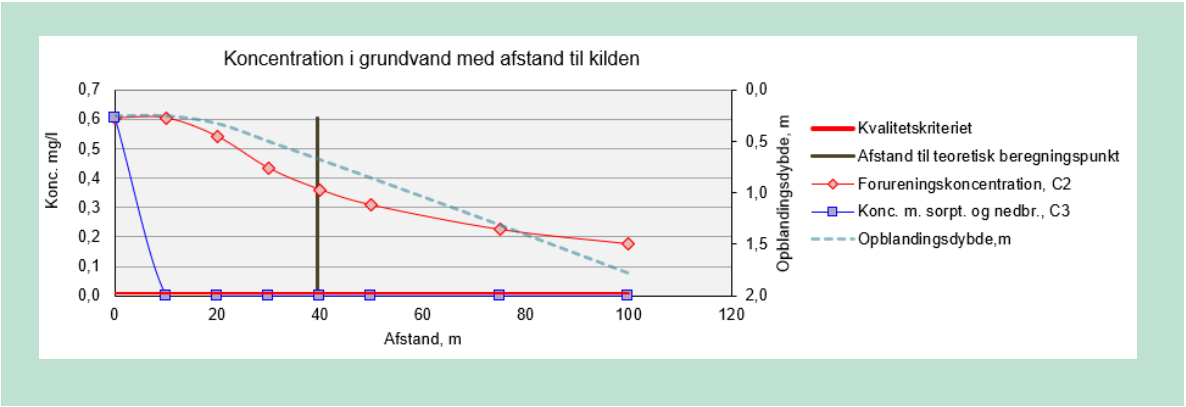
Benzin udviser generelt højere mobilitet i jorden end olie, hvilket primært skyldes den mindre molekylestørrelse, lavere viskositet og lavere sorptionsaffinitet.

Benzinadditivet MTBE kan medføre endog meget store faneudbredelser, men for benzin uden MTBE (typisk benzin solgt efter 2001) ses dog sjældent fanelængder på mere end 200 m /Miljøstyrelsen, 2014b/. Dette stemmer overens med en amerikansk erfaringsopsamling med mere end 600 benzinforurenede lokaliteter, hvor fanelængden generelt var maksimalt 106 m (90% fraktil) /API, 1998/.

1.3 Betydning af biologisk nedbrydning

Den relativt begrænsede udbredelse af olie- og benzinforureninger skyldes især stoffernes biologiske nedbrydelighed i jord og grundvand. Når nedbrydningen inkluderes i risikoberegninger har den typisk meget stor betydning for udkommet. I værktøjer som Miljøstyrelsens JAGG-model, eller det nyere GrundRisk, vil selv meget konservative nedbrydningsrater medføre en markant reduceret faneudbredelse sammenlignet med beregningsscenarier uden nedbrydning.

Figur 3 viser et beregningsresultat fra JAGG2.1, hvor der er inddraget en konservativ nedbrydningsrate for dodecan (C_{12}) /Miljøstyrelsen, 2018/. Dodecan anvendes ofte som modelstof for totalindhold af kulbrinter (total petroleum hydrocarbons, TPH), bestående af diesel- og fyringsolie. Med en kildestyrkekoncentration på 600 µg/l ses nedbrydningen at føre til en forureningsudbredelse på <10 m (C3). Til sammenligning vil den beregningsmæssige udbredelse være >100 m, hvis ikke der tages hensyn til nedbrydning (C2).



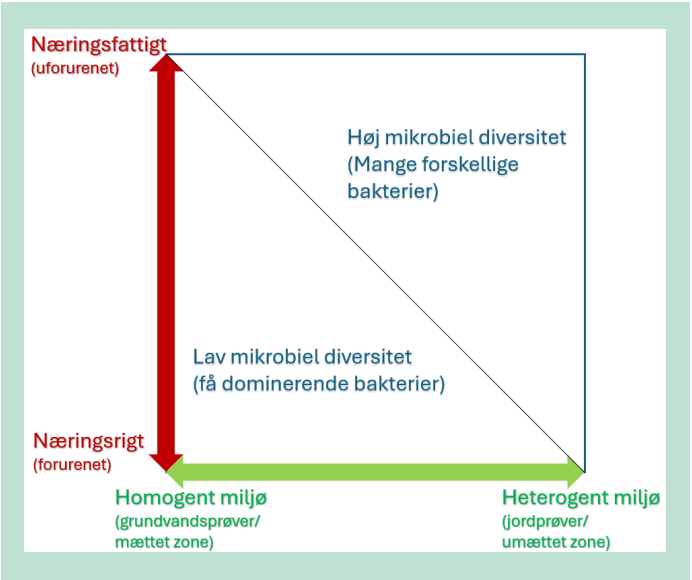
FIGUR 3. Modelberegning i JAGG2.1 for udbredelse af kulbrinter i en grundvandsfane hhv. uden (C2) og med (C3) naturlig biologisk nedbrydning. Dodecan er anvendt som modelstof med en aerob nedbrydningsrate på 0,01 d^{-1}, jf. anbefalingerne i en erfaringsopsamling fra 2018 udarbejdet til brug i GrundRisk /Miljøstyrelsen, 2018/. Der er sammenlignet med et kvalitetskriterium på 9 µg/l /Miljøstyrelsen, 2021b/.

Modelberegninger baseres typisk på "steady state"-antagelser med en konstant kildestyrkekoncentration og uendelig kilde. I praksis reduceres både kildestyrke og hotspot-areal i kildeområdet over tid som følge af transport- og nedbrydningsprocesserne, der er centrale mekanismer for stabilisering af forureningsfaner og dermed også for den langsigtede påvirkning af grundvandet. Denne dynamik har direkte betydning for myndigheders vurdering af risiko, tidsudvikling og behov for afværge.

1.4 Styrende parametre for naturlig nedbrydning

Jord indeholder naturligt store mikrobielle populationer, hvoraf en vis andel er i stand til at nedbryde kulbrinteforurening, og selv i relativt ekstreme miljøer vil der typisk være kulbrintenedbrydere til stede /Atlas, 1981; El-Baz et al., 2025/.

Efter tilførsel af forurening sker der en selektion, hvor kulbrintenedbryderne øges i relativ og absolut forekomst. Det medfører en reduceret mikrobiel diversitet, men også en øget biomasse i de forurenede zoner. Diversiteten styres desuden af miljøets heterogenitet og tilgængelighed af f.eks. næringsstoffer (figur 4).



FIGUR 4. Betydning af heterogenitet og indhold af substrat for mikrobiel diversitet.

Udover af tilstedeværelsen af kulbrintenedbrydere, afhænger selve nedbrydningshastigheden af en række miljømæssige parametre /Kristensen, 2010/, herunder:

- Substratkoncentration og -sammensætning
- Tilgængelighed af elektronacceptorer, særligt ilt
- Næringsstoffer, især kvælstof og fosfor
- Jordtype, pH, dybde og vandindhold
- Befæstelsesgrad og dermed ilt- og vandtilførsel.

Kulbrinternes (dvs. substratets) kemiske struktur er typisk den vigtigste faktor for betydningen af naturlig nedbrydning. Enkle, kortkædede n-alkaner nedbrydes hurtigst, mens langkædede, komplekse, aromatiske eller forgrenede strukturer nedbrydes langsomt /Atlas, 1981/. Konkret vil det betyde, at motor-/smøreolie og heavy fuelolie generelt nedbrydes langsommere end dieselolie og benzin.

1.5 Traditionel dokumentation for naturlig nedbrydning

Historisk set har naturlig nedbrydning kun i begrænset omfang været inddraget i risikovurderinger i Danmark. Det skyldes dels et ønske om konservative vurderinger, og dels en mangel på standardiserede dokumentationsmetoder.

Både i udlandet og herhjemme er der imidlertid arbejdet intenst med udvikling af koncepter og metoder til kvantitativ dokumentation for den naturlige nedbrydning af kulbrinter /Kristensen, 2010; Miljøstyrelsen, 2012/. Det har dog ikke resulteret i et paradigmeskifte herhjemme. Årsagen hertil er sandsynligvis, at mange af de kvantitative metoder og strategier indebærer relativt omfattende undersøgelser og dermed omkostninger og en kompleksitet, som kan være en barriere for implementering i rutinemæssige undersøgelser.

Kvalitative metoder udgør en mere indirekte dokumentation og er typisk nemmere at anvende. De kan f.eks. omfatte monitering af forureningens udbredelse, koncentrationer eller masse over tid. Her spiller andre processer dog også en rolle, herunder sorption, dispersion, fortynding og fluktuerende grundvandsspejl.

Kvalitativ dokumentation kan også omfatte bestemmelse af redoxforhold, idet naturlige nedbrydningsprocesser typisk forbruger de eksterne elektronacceptorer. Her skal man dog være opmærksom på, at særligt iltindholdet kan være naturlig lavt i højorganiske jorde eller hvis der er sket udsivning af spildevand fra kloakker, hvilket kan vanskeliggøre en entydig tolkning.

1.6 Inddragelse af nedbrydningsrater i dag

Indførelsen af modelværktøjet GrundRisk i 2023-2025 har erstattet grundvandsmodulet i JAGG på mange regionssager med risikovurdering af punktkildeforureninger. I den forbindelse har Miljøstyrelsen og regionerne åbnet op for i højere grad at anvende litteraturværdier for nedbrydningsrater i risikoberegninger, hvis der foreligger kvalitativ dokumentation for naturlig biologisk nedbrydning på den konkrete lokalitet.

Konservative litteraturværdier for 1. ordens nedbrydningsrater (k_1) er sammenfattet i et miljøprojekt fra 2018 /Miljøstyrelsen, 2018/. Nedbrydningsraterne er typisk bestemt i laboratoriet med udgangspunkt i jordprøver, men enkelte stammer også fra *in situ*-forsøg i felten, herunder *in situ*-respirationstests /Kristensen, 2010/. Fælles for både laboratoriemetoder *og in situ*-tests er, at de generelt har svært ved at simulere repræsentative forhold, herunder skala, rumlig/tidslig variabilitet samt begrænsning af elektronacceptorer eller næringsstoffer /Kristensen, 2010/.

Problemet med skala er større i laboratorieforsøg end ved *in situ* målinger, der dog er dyrere og mere komplicerede at udføre.

1.7 DNA-analyser

DNA-analyser repræsenterer en alternativ strategi til kvalitativ dokumentation, idet metoden belyser sammensætningen af den mikrobielle biomasse, der ændrer sig efter forurening af jord eller grundvand. Tilførsel af kulbrinter vil selektere de bakterier, der kan bruge stofferne i deres metabolisme. Ligeledes kan kulbrinteforurening have en hæmmende eller direkte toksisk effekt på andre mere følsomme bakterier, der så vil findes i mindre omfang end i upåvirket jord. Analyse af DNA-sammensætningen i en jord- eller grundvandsprøve kan derfor være med til kvalitativt at dokumentere, om der foregår eller kan foregå naturlig nedbrydning.

DNA-metoderne kan i dag ikke bruges til estimering af nedbrydningsrater, der kan indgå kvantitativt i risiko- eller transportberegninger. Imidlertid kan kvalitativ dokumentation typisk bane vejen for at inddrage en konservativ nedbrydningsrate, der som nævnt var én af tankerne bag GrundRisk.

Udviklingen af DNA-metoderne har desuden gjort det muligt at identificere de organismer og biologiske mekanismer, der er involveret i bioremediering. Det har styrket forskningen i nedbrydning af kulbrinter og andre organiske forureninger i jord og grundvand verden over /Allen et al, 2007; Bôto et al., 2021; Cabral et al., 2022; Fuentes et al., 2014; Hauptfeld et al., 2022/.

1.8 Formål

Projektets overordnede formål har været at styrke vidensgrundlaget for anvendelse af DNA-baserede metoder til kvalitativ dokumentation for naturlig nedbrydning i forbindelse med risikovurdering af kulbrinteforureninger. Dette er søgt opnået gennem:

- Udvidelse af erfaringsgrundlaget for DNA-sekventering med udgangspunkt i jordprøver fra fem testlokaliteter forurenet med kulbrinter.
- Afprøvning af metoden på grundvandsprøver udtaget på syv lokaliteter forurenet med kulbrinter.
- Test af metodens anvendelighed ved grundvandsforurening med perkolat (kompleks forureningssammensætning).
- Udarbejdelse af anbefalinger til felt- og analyseprotokoller med henblik på fremtidig myndighedsanvendelse.

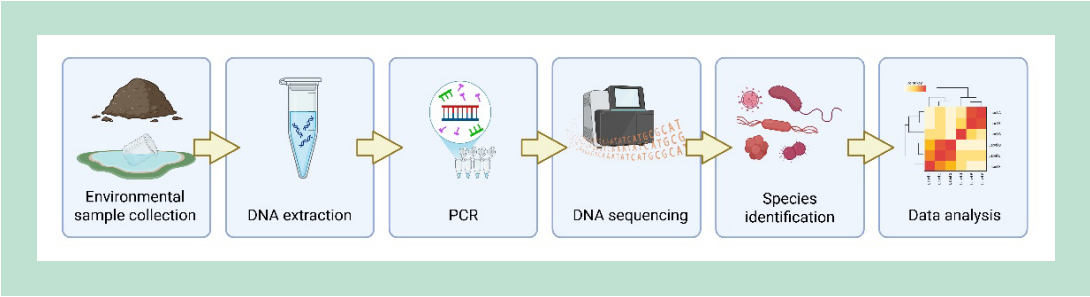
2. DNA-analyse af miljøprøver

2.1 Princip for DNA-metoder

Undersøgelse af DNA-sammensætningen i miljøprøver foretages typisk ved DNA-sekventering. Metoden muliggør karakterisering af komplekse mikrobielle samfund i deres oprindelige miljø ud fra korte DNA-fragmenter fra bakteriernes eget genom. Resultaterne anvendes til at identificere hvilke bakterielle taxa, der findes i prøven samt deres relative forekomst. Herved opnås indsigt i samfundsstrukturen og de potentielle biologiske processer, som udføres af mikroorganismerne, herunder nedbrydning af organiske forureninger.

Ved bakterielle analyser anvendes ofte 16S rRNA-genet, der forekommer i alle bakterier, og har en høj forekomst i hver celle. Referencedatabaser for netop dette gen er samtidig meget omfattende, hvilket giver grundlag for en følsom detektion, og en sammenlignelig karakterisering på tværs af prøver.

Den biologiske mangfoldighed man indfanger ved DNA-sekventering udtrykkes typisk som amplikonsekvensvarianter (ASV), der repræsenterer biologiske unikke DNA-sekvenser i prøven. ASV-baserede tilgange giver høj opløsning og muliggør sammenligning mellem forurenede og upåvirkede miljøer.



FIGUR 5. Skematisk oversigt over arbejdsgangen ved amplikonsekventering, fra prøvetagning til bioinformatisk og økologisk analyse

2.2 DNA-sekventering af miljøprøver

Et af de tidligste studier af bakteriesammensætning i miljøprøver blev publiceret i 2006 og omfattede karakterisering af den mikrobielle diversitet i marine vandprøver /Sogin et al, 2006/. Studiet omfattede få tusinde sekvenser per prøve, hvilket på daværende tidspunkt repræsenterede en væsentlig teknologisk udvikling. Siden er DNA-sekventering blevet markant mere tilgængelig og kan i dag generere millioner af sekvenser fra enkeltprøver, herunder jord- og grundvandsprøver /Hugerth og Andersson, 2017/. Den teknologiske udvikling har muliggjort rutinemæssig anvendelse i både forskning og anvendt miljøovervågning. Metoden anvendes i dag bredt til kortlægning af mikrobielle samfund i medicinske, industrielle, tekniske og naturlige miljøer. Centrale internationale og nationale initiativer omfatter blandt andet:

- Earth Microbiome Project /Thompson et al., 2017/, som kortlægger globale jordmikrobiomer
- MicroFlora Danica-projektet som kortlægger bakteriesamfund i danske miljøer / Singleton et al., 2024; Singleton et al., 2026/
- MiDAS-databasen /Dueholm et al., 2022/, som beskriver mikrobiomet i danske spildevandsanlæg.

DNA-baserede miljøundersøgelser har bidraget til en øget forståelse af en række mikrobielle processer, herunder drivhusgasemissioner /Bahram et al., 2022/, biogasproduktion /de Jonge et al., 2020/, kortlægning af mikrobiomer i forskellige jordtyper /Danielsen et al., 2023/ og nedbrydning af forureninger som f.eks. medicinrester i renset spildevand /Arriaga et al., 2016/.

2.3 Erfaringer fra forurenede lokaliteter

I Danmark blev DNA-sekventering første gang anvendt i en konkret forureningssag i 2018 i forbindelse med grundvandsforurening med fyringsolie fra en villaolietank /Larsen et al., 2018/. Arbejdet blev gennemført i et samarbejde mellem DMR, Oliebranchens Miljøpulje og Center for mikrobielle systemer ved Aalborg Universitet (AAU). Allerede en måned efter spildet kunne der konstateres en ændring i bakteriesamfundets sammensætning og en øget biomasse i det forurenede grundvand. Resultaterne indikerede aktiv biologisk omsætning af kulbrinter.

I perioden 2018 til 2021 blev metoden videreudviklet og afprøvet på to danske testlokaliteter med henblik på anvendelse på jordprøver /Miljøstyrelsen, 2021a/. Undersøgelserne dokumenterede tilsvarende mikrobielle ændringer i kulbrinteforurenet jord i den umættede zone og understøttede metodens anvendelighed til kvalitativ dokumentation af naturlig nedbrydning.

De foreløbige erfaringer peger på, at DNA-sekventering kan udvikles til et standardiseret supplement til traditionelle miljøtekniske undersøgelser. Metoden kan bidrage til at dokumentere biologisk aktivitet og dermed understøtte inddragelse af naturlig nedbrydning i risikovurderinger. Dermed åbnes for anvendelse af konservative nedbrydningsrater fra litteraturen i modelberegninger. DNA-analyser kan i princippet udføres på baggrund af enkeltprøver udtaget i forbindelse med traditionelle afgrænsende forureningsundersøgelser.

Før bred myndighedsanvendelse er det imidlertid nødvendigt at udbygge erfaringsgrundlaget samt de referencedatabaser specifikt møntet på olieforurenede jorde, der danner basis for vurdering af resultaterne fra DNA-sekventeringen. Et styrket datagrundlag vil gøre det muligt, på baggrund af et begrænset antal prøver, at vurdere om der foregår biologisk nedbrydning på en lokalitet. Dette kan indgå i beslutningsgrundlaget ved:

- Risikovurdering af grundvandstruende forureninger
- Vurdering af faneudvikling og stabilitet
- Prioritering af afværgeindsatser
- Valg af afværgestrategi, herunder overvåget naturlig nedbrydning.

2.4 Sammenligning med andre dokumentationsmetoder

Dokumentation af naturlig nedbrydning ved kulbrinteforureninger kan baseres på flere komplementære metodetilgange, der varierer i dokumentationsstyrke, kompleksitet og omkostningsniveau. Valg af metode afhænger af formålet med undersøgelsen samt kravene til sikkerhed i risikovurderingen.

En veletableret kvantitativ metode er isotopfraktionering, der typisk udføres som Compound Specific Isotope Analysis (CSIA) /Braeckevelt et al., 2012/. Metoden er baseret på ændringer i isotopsammensætningen af forureningskomponenter. Under biologisk omsætning ses en relativ berigelse af tunge isotoper i restfraktionen og kan således dokumentere biologisk nedbrydning, og give en semikvantitativ vurdering af nedbrydningsgraden, hvilket giver en stærk dokumentation. Metoden er dog forbundet med væsentlige analytiske omkostninger og krav til prøvekvalitet, og anvendes derfor primært i sager med højt beslutningsbehov, f.eks. ved komplekse fanesystemer eller hvor der ønskes dokumentation for effekten af afværgetiltag.

Andre dokumentationsmetoder omfatter redox- og geokemiske indikatorer, koncentrations- og massebalancer, metabolit- og nedbrydningsproduktanalyser, samt molekylærbiologiske metoder (f.eks. qPCR af funktionelle gener involveret i specifikke processer).

DNA-baserede metoder adskiller sig fra andre dokumentationsmetoder ved primært at belyse det biologiske potentiale og samfundsrespons frem for den direkte stofomsætning. Metoden kan derfor karakteriseres som en kvalitativ eller semiindikativ dokumentationsform og giver en mere direkte kobling til de mikroorganismer, der driver nedbrydningen.

I praksis kan DNA-analyser anvendes som screeningsværktøj til at vurdere, om der er indikationer på biologisk nedbrydning. Ved behov for stærkere dokumentation kan dette efterfølges af isotopfraktionering eller udvidede geokemiske undersøgelser.

En sådan trinvist opbygget dokumentationsstrategi kan bidrage til at optimere ressourceanvendelsen i myndighedsarbejdet, samtidig med at beslutningsgrundlaget for risikovurdering og afværgestrategi styrkes.

TABEL 1. Forskellige metoder og strategier for dokumentation af naturlig nedbrydning,

Metode	Dokumentationsstyrke	Prisniveau	Anvendelighed i praksis	Primær dokumentationstype	Styrker
DNA-sekventering	Middel (kvalitativ)	Lav–middel	Høj	Mikrobiel sammensætning og respons	Kan påvise selektion for nedbrydere. Kræver få prøver. Kan integreres i standardundersøgelser
Funktionelle gener (qPCR eller ddPCR)	Middel	Middel	Middel	Tilstedeværelse af nedbrydningsgener	Mere målrettet end diversitetsanalyser. Kvantificerbar genforekomst
Isotopfraktionering (CSIA)	Høj	Høj	Middel–lav	Isotopisk fraktionering ved nedbrydning	Direkte dokumentation for biologisk omsætning. Kan indikere nedbrydningsgrad
Redox- og geokemiske indikatorer	Lav–middel	Lav	Høj	Elektronacceptorforbrug og metabolitter	Hurtig og billig screening. Velegnet til monitering
Koncentrations- og massebalancer	Middel	Lav–middel	Høj	Udvikling i koncentration og masse	Baseret på standarddata. Let at integrere i modeller
Metabolit-/nedbrydningsprodukter	Middel- Høj	Middel	Middel	Påvisning af nedbrydningsveje	Stærk dokumentation ved simple stofsystemer
In situ nedbrydningsforsøg	Høj	Høj	Lav	Direkte målt omsætning i felt	Realistiske forhold. Kvantificerbar nedbrydning
Laboratoriebaserede mikrokosmer	Middel	Middel	Middel	Potentiel nedbrydningskapacitet	Kontrollerede forhold. Sammenlignelige tests

3. Udførte undersøgelser

3.1 Testlokaliteter

Projektet omfatter undersøgelser fra syv danske lokaliteter forurenet med olie- og benzinprodukter. Derudover er der inddraget data fra to kulbrinteforurenede lokaliteter fra et tidligere miljøprojekt /Miljøstyrelsen, 2021a/. Det samlede datagrundlag er væsentligt udvidet sammenlignet med tidligere.

Endvidere indgår DNA-analyser fra en grundvandsforurening ved en tidligere losseplads med en mere kompleks forureningssammensætning. Formålet har været at belyse metodens anvendelighed under perkolat-påvirkede forhold, hvor flere forureningskomponenter kan påvirke mikrobiomet samtidig.

Sammenlagt inddrager projektet ti testlokaliteter fra Midtjylland (6 stk.), Fyn (2 stk.) og Sjælland (2 stk.). Lokaliteterne omfatter både sandede og lerede aflejringer. Prøvetagningen er desuden strategisk tilrettelagt med henblik på at omfatte både kraftigt forurenede prøver, svagt forurenede prøver og prøver uden forurening (referenceprøver) samt lokaliteter forurenet med forskellige olie- og benzinprodukter. Tabel 2 sammenfatter nøgleoplysninger om testlokaliteterne, herunder forureningstype og antal analyserede jord- og grundvandsprøver.

TABEL 2. Testlokaliteter inddraget i projektet. De angivne prøveantal omfatter prøver indsendt til laboratoriet. Antallet af analyserede delprøver er større, da der flere steder er anvendt replikater fra de udtagne jord- og grundvandsprøver.

Lokalitet	By	Forureningstype	Antal jordprøver	Antal grundvandsprøver
HOJ1	Højbjerg, Aarhus	Benzin	20	7
VEK	Veksø, Sjælland	Benzin	0	10
BLO	Blommenslyst, Fyn	Dieselolie	15	3
LAN	Langeskov, Fyn	Dieselolie	10	5
HOJ2	Højbjerg, Aarhus	Dieselolie	0	6
HOJ3	Højbjerg, Aarhus	Fyringsolie	9	11
EBE	Ebeltoft, Østjylland	Fyringsolie	21	6
VIB1*	Viby, Aarhus	Petroleum/fyringsolie	20	0
VIB2*	Viby, Aarhus	Benzin/dieselolie	23	0
LYN	Lynge, Nordsjælland	Lossepladsperkolat med bl.a. PFAS og phenoxysyrer	0	52

* Resultater fra VIB1 og VIB2 er tidligere beskrevet i et miljøprojekt fra 2021 /Miljøstyrelsen, 2021a/.

3.2 Prøvehåndtering

3.2.1 Grundvandsprøver til DNA-sekventering

Grundvandsprøverne blev udtaget fra eksisterende moniteringsfiltre (ø63 mm) etableret i forbindelse med traditionelle forureningsundersøgelser. Fremgangsmåden muliggør integration af DNA-analyser i almindelige undersøgelsesprogrammer (figur 6).

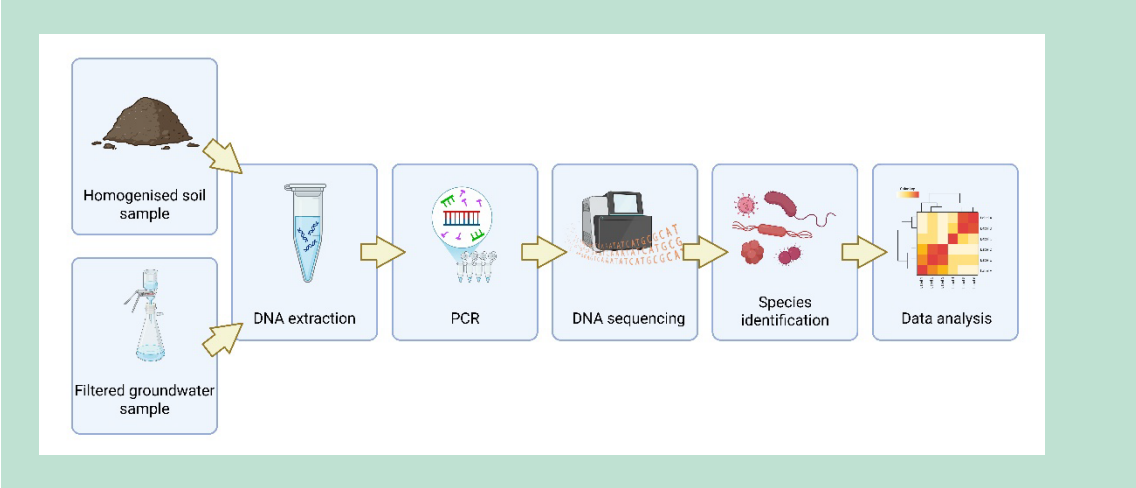
En del af grundvandsprøverne blev ved prøvetagningen filtreret igennem et 0,22 µm nitrocellulosefilter, mens øvrige prøver blev filtreret efter modtagelse på laboratoriet. Umiddelbart efter prøvetagning blev prøver og filtre nedkølet til maks. 5-10 °C og transporteret til laboratoriet, hvor de blev opbevaret ved maks. -18 °C indtil analysearbejdet kunne påbegyndes.

Forud for DNA-ekstraktion blev filtrene delt i to, og halvdelen blev skåret i mindre stykker med en steril skalpel og overført til et sterilt Eppendorf-rør og den anden halvdel blev gemt til senere kontrol hvis nødvendigt. DNA-sekventeringen blev generelt udført som enkeltbestemmelser for hver indsendt grundvandsprøve.

3.2.2 Jordprøver til DNA-sekventering

Jordprøver på 0,2-0,5 kg blev udtaget i gastætte Rilsanposer uden headspace for at minimere iltpåvirkning. Prøverne blev nedkølet umiddelbart til maks. 5-10°C straks efter prøvetagning og transporteret til laboratoriet, hvor de blev opbevaret ved maks. -18°C frem til analyse.

Inden DNA-ekstraktion blev prøverne homogeniseret mekanisk ved at massere posen indtil indholdet fremstod ensartet. Delprøver á 0,25 g blev udtaget og overført til et sterilt Eppendorf-rør til brug i DNA-ekstraktionen. Indledende analyser omfattede replikater for udvalgte lokaliteter med henblik på vurdering og metodens reproducerbarhed (VIB1 og VIB2). Da variationen mellem replikater var begrænset, blev der efterfølgende anvendt enkeltbestemmelser. Figur 6 illustrerer analyseforløbet for jordprøver.



FIGUR 6. Oversigt over den samlede arbejdsgang ved DNA-analyse af jord- og grundvandsprøver fra prøvetagning til sekventering.

3.2.3 pH-bestemmelse

For alle jordprøver (undtagen VIB1 og VIB2) blev pH bestemt efter opslæmning af en delprøve på 10 g jord i 1 M KCl-opløsning, jf. DS/EN ISO 10390:2022.

3.3 DNA-analyse

3.3.1 DNA-ekstraktion

DNA blev ekstraheret fra jord og filtreret grundvand ved anvendelse af et kommercielt kit optimeret til miljøprøver (DNeasy PowerLyzer PowerSoil kit) efter producentens anbefalinger. Efter ekstraktion blev DNA-kvalitet og -mængde analyseret vha. gelelektroforese (TapeStation) og fluorometrisk kvantificering (Qubit). Den ekstraherbare DNA-mængde anvendes som en samlet indikator for mikrobiel biomasse og kan indgå i vurderingen af biologisk respons i forurenede prøver sammenlignet med referenceprøver.

3.3.2 Sekventering og databehandling

16S rRNA genets V1-V3 region blev opformeret ved Polymerase Chain Reaction (PCR), som tidligere beskrevet /Albertsen et al., 2015/. Den er velegnet til bakteriel identifikation og har været anvendt i en række internationale mikrobiomprojekter som f.eks. Human Microbiome Projekt, som havde til formål at kortlægge det humane mikrobiom /Turnbaugh et al., 2007/.

PCR blev udført i duplikat. PCR-produkter blev oprenset med Ampure XP SPRI bead-protokol (Beckmann-Coulter). Prøverne blev sekventeret på en Illumina MiSeq sequencer indstillet til 2×300bp "paired-end" sekventering. Alle sekventeringer omfattede både positive og negative kontroller for at kontrollere analysekvaliteten.

Rådata blev behandlet bioinformatisk ved hjælp af pipelinen "AmpProc5.1" /Yashiro, 2023/, og taksonomisk klassificeret med nyeste MiDAS database v4 /Dueholm et al., 2022/. Resultaterne udtrykkes som amplikonsekventeringsvarianter (ASV'er), der repræsenterer den relative biologiske artssammensætning, men som ikke kan oversættes direkte til antallet af bakterier indenfor de enkelte arter. Mikrobiomdatasættet blev analyseret ved hjælp af multivariat statistisk analyse i softwaren R.

Indledningsvis blev der foretaget en multikorrelationsanalyse – kaldet en beta-diversitetsanalyse – hhv. med PCA (Principal Component Analysis) og NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) med henblik på at undersøge hvor meget artssammensætningen i de enkelte prøver ligner hinanden og afspejler forureningsgraden (gruppering i datamaterialet). På baggrund af denne analyse er der foretaget en vurdering af hvilke prøver, hvor biomassen har ændret sammensætning som følge af forurening sammenlignet med referenceprøverne. Yderligere er der udført en Spearman's korrelationsanalyse for at undersøge hvilke bakteriegrupper, der har en positiv korrelation med stigende forureningsindhold. Det samlede datagrundlag udgør herefter en ressource, der kan anvendes ved fremtidige DNA-sekventeringer - også uden viden om forureningsindhold.

3.4 Beskrivelse af datasæt

Det samlede datasæt, som blev anvendt i DNA-analyseprocessen, omfatter 261 delprøver (jord- eller grundvandsprøver). Flere delprøver stammer fra samme feltprøve som tekniske replikater med henblik på at øge datarobustheden. Delprøver med mislykkede analyser indgår ikke i datasættet. En oversigt er vist i nedenstående tabel.

TABEL 3. Oversigt over datasæt anvendt i den statistiske databehandling.

Lokalitet	Forurening	Datapunkter, grundvand	Kulbrinter, µg/l	Datapunkter, jord	Kulbrinter, mg/kg TS
VEK	Kulbrinter	8	0.1 – 300.000	0	
EBE	Kulbrinter	6	0.1 – 930	15	0.1 – 10.000
BLO	Kulbrinter	2	0.01 - 40	9	-
LAN	Kulbrinter	5	5 - 280	7	0.1 – 5.300
HOJ1	Kulbrinter	6	0.1 – 29.000	5	0.1 – 550
HOJ2	Kulbrinter	2	0.1	0	-
HOJ3	Kulbrinter	6	0.1 - 43	9	0.1 – 23
LYN	Perkolat	40	-	0	-
VIB1	Kulbrinter	0	-	43	0.01 – 1.000
VIB2	Kulbrinter	I0	-	59	0.01 – 4.200

Prøver med utilstrækkelig sekvensantal blev ekskluderet. Et minimum på 1.000 sekvenser pr. prøve blev anvendt som inklusionsgrænse for at sikre repræsentativ dækning af de dominerende mikrobielle populationer. Efter kvalitetsfiltrering, indgik 222 prøver i den statistiske databehandling fordelt på de ti lokaliteter. Datasættet omfattede samlet 17.494 sekvensvarianter, med en gennemsnitlig sekvensdybde på ca. 29.000 sekvenser pr. prøve.

Datasættets størrelse og variation muliggør robuste statistiske analyser og styrker grundlaget for anvendelse af DNA-baseret dokumentation.

4. Resultater

4.1 Indledende dataanalyse

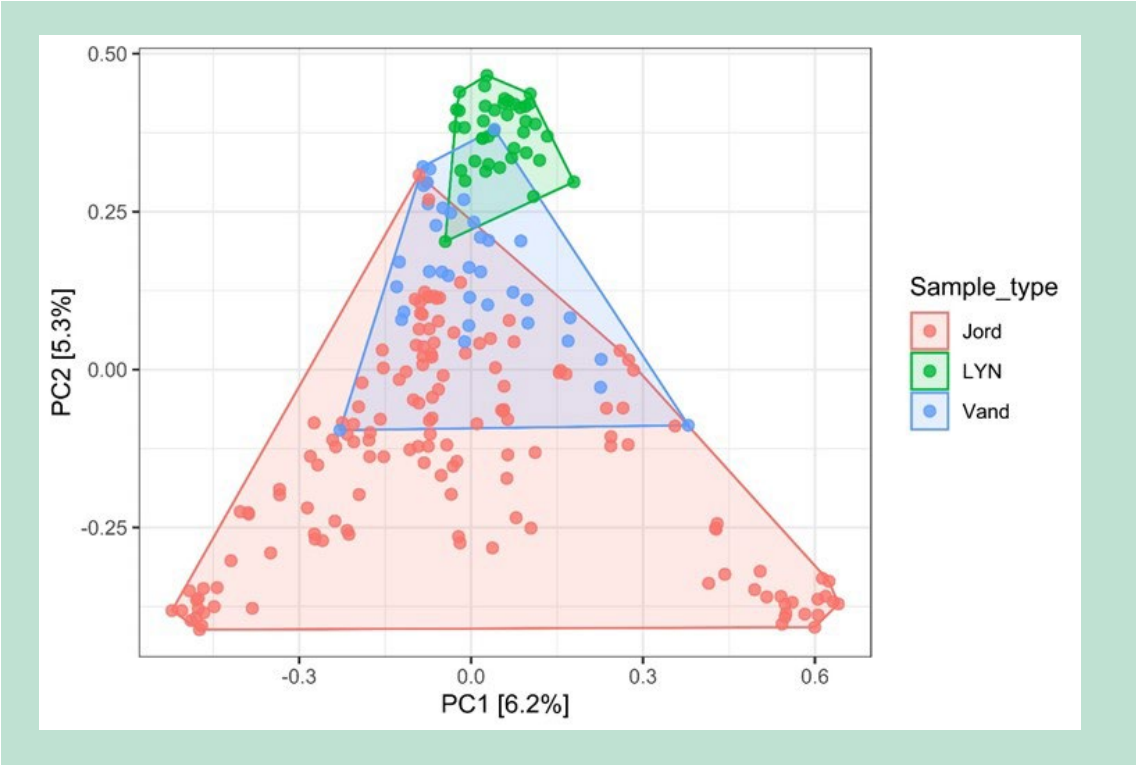
En overordnet beta-diversitetsanalyse af det samlede datasæt blev udført ved Principal Component Analysis (PCA). Hver delprøve er repræsenteret som et punkt, hvor den indbyrdes afstand afspejler forskelle i den mikrobielle sammensætning (figur 7).

Resultaterne viser, at prøver fra lokalitet LYN, der udelukkende omfatter grundvandsprøver fra en perkolat-forurenet lokalitet, adskiller sig markant fra de øvrige prøver. Jord- og grundvandsprøver fra kulbrinteforurenede lokaliteter udviser derimod betydeligt overlap. Jordprøverne viser en større spredning i ordinationsrummet end grundvandsprøverne, hvilket afspejler højere mikrobiel diversitet og større geologisk heterogenitet.

På den baggrund er den videre databehandling opdelt i tre analyseenheder:

- Kulbrinteforurenet grundvand (Vand)
- Kulbrinteforurenet jord (Jord)
- Perkolat-påvirket grundvand (LYN)

Denne opdeling øger fortolkningsstyrken i en risikovurderingsmæssig kontekst.



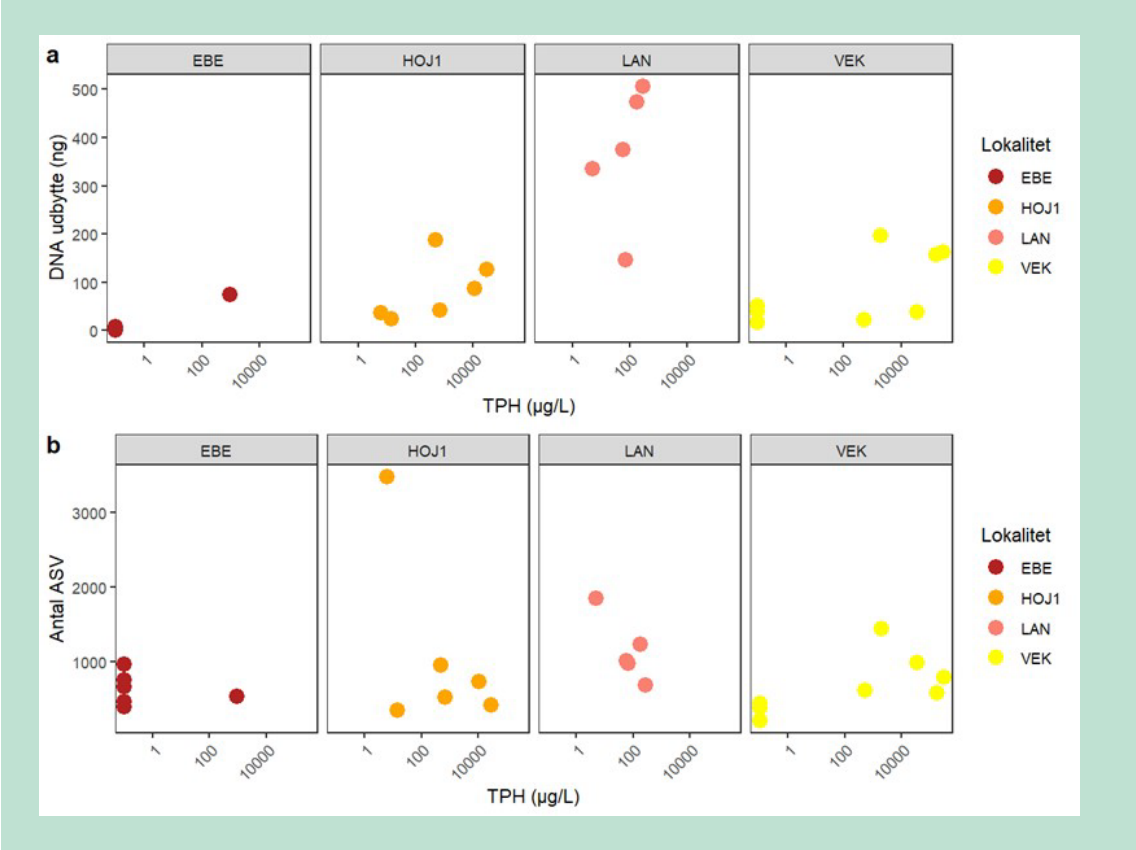
FIGUR 7. Beta diversitetsanalyse (PCA) af det samlede datasæt. Hvert punkt repræsenterer mikrobiomet i én delprøve. Procenttallet på akserne angiver forklaringsgraden af prøvernes fordeling på den pågældende akse. Prøvegrupperinger er farvet efter overordnet inddeling: Grundvandsprøver fra LYN (losseplads) og jord- eller grundvandsprøver fra kulbrinteforurenede lokaliteter.

4.2 Kulbrinteforurenet grundvand

Lokaliteterne BLO, EBE, HOJ1, HOJ2, HOJ3, LAN og VEK indgår i denne analyse, som består af 35 prøver med et gennemsnit på 45.050 sekvenser per prøve, som er fordelt over 10.953 registrerede biologiske artsvarianter (ASV'er).

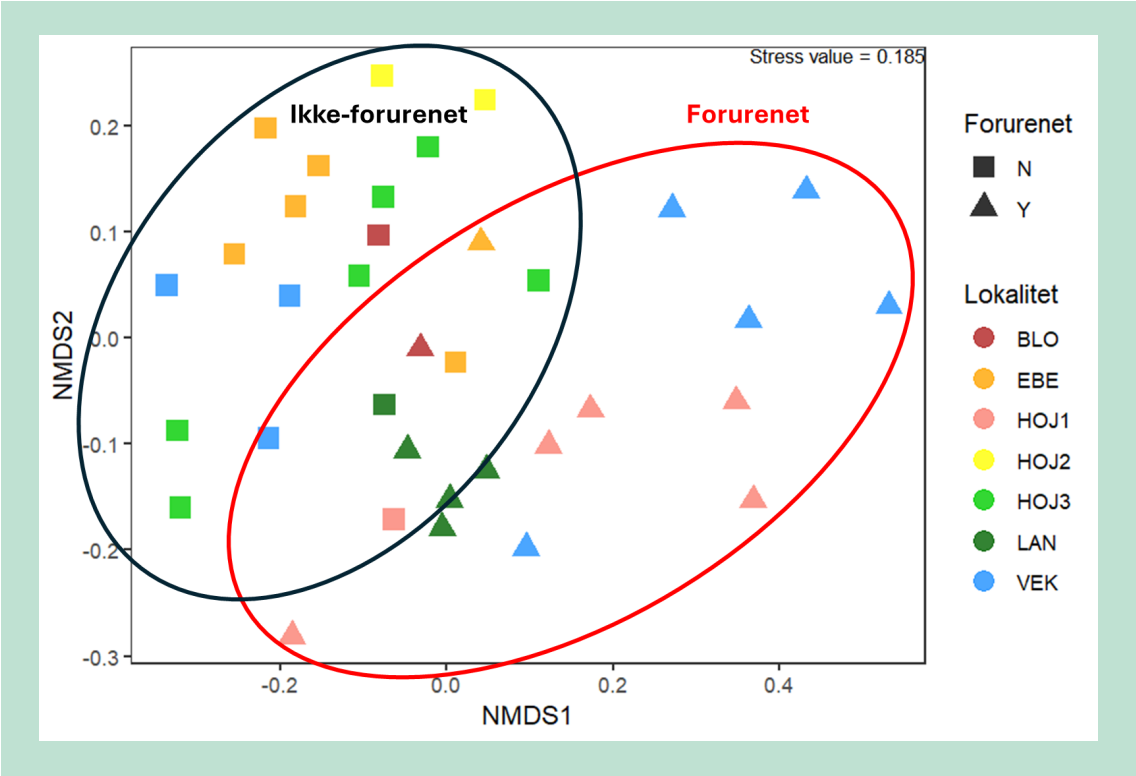
4.2.1 DNA-udbytte og mikrobiel diversitet

For grundvandsprøverne var der et DNA-udbytte mellem 0,1 og 840 ng per prøve, mens kulbrinteindholdet varierede fra "ikke påvist" til 300.000 µg/L. Der observeredes en svag sammenhæng mellem kulbrinteindhold og biomassens størrelse målt som DNA-udbytte ved ekstraktionen (figur 8a). Det indikerer en øget mikrobiel biomasse ved højere forureningsniveauer. Derimod sås ingen entydig sammenhæng mellem kulbrinteindhold og antal ASV'er, hvilket tyder på, at forurening primært påvirker biomasse frem for diversitet (figur 8b).



FIGUR 8. Forholdet mellem TPH og DNA-udbytte (a) og antal ASV (b) i de analyserede grundvandsprøver fra kulbrinteforurenede lokaliteter. Punkterne er farvet efter lokalitet. Der er kun medtaget data fra lokaliteter, hvor TPH og DNA-udbyttedata er tilgængelige.

En NMDS-baseret beta-diversitetsanalyse viste tydelig forskydning i mikrobiel sammensætning mellem forurenede og ikke-forurenede prøver. Den såkaldte Bray-Curtis-afstand blev anvendt, hvor værdierne går fra 0 (fuldstændig ens) til 1 (intet til fælles). NMDS-analysen, som er visualiseret i figur 9, viser en tydelig effekt af kulbrinteforurening på den mikrobielle sammensætning med forurenede prøver placeret til højre i plottet og ikke-forurenede prøver til venstre. Overlap forekom dog, hvilket indikerer lokalitetsspecifik variation.

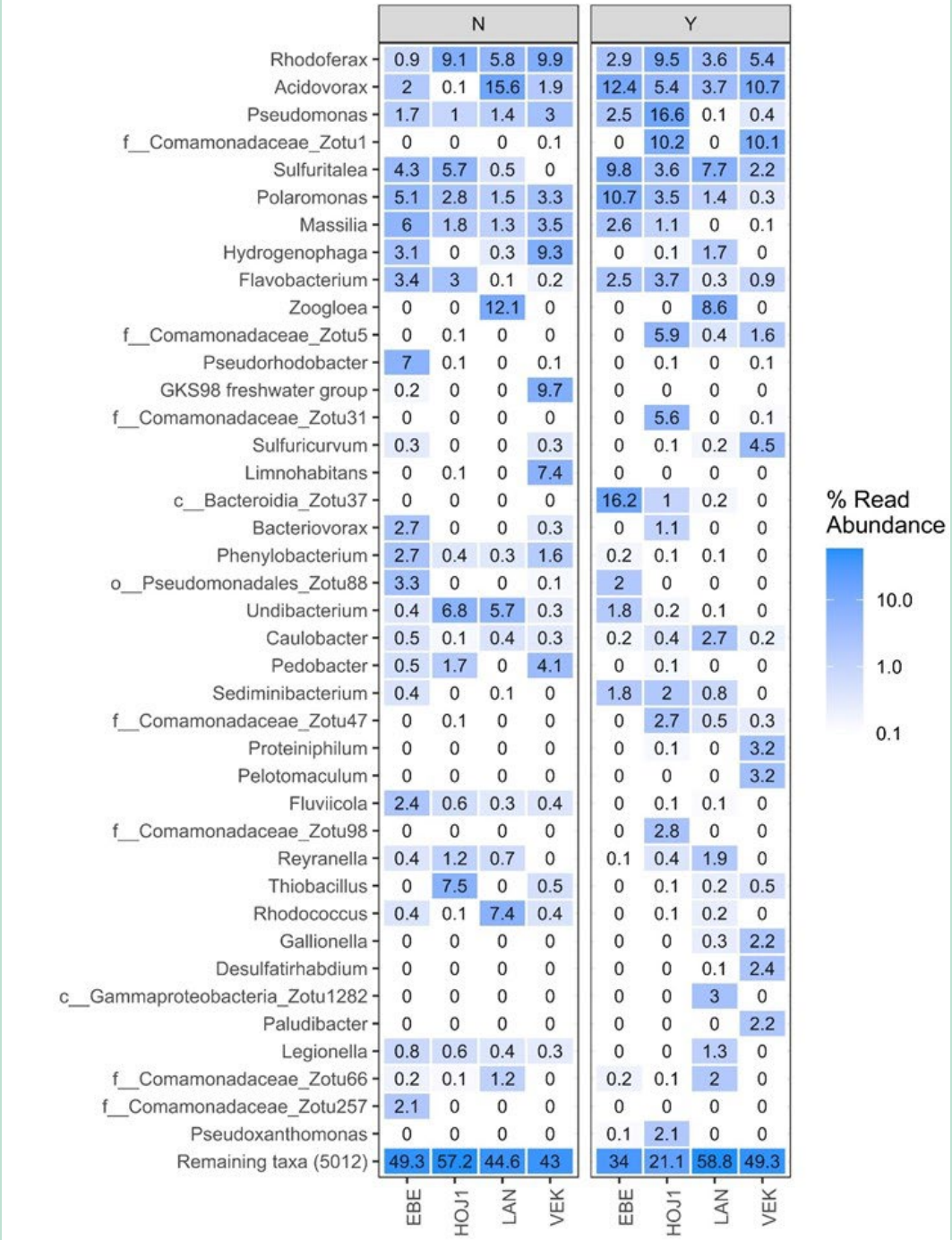


FIGUR 9. Beta-diversitetsanalyse af de analyserede vandprøver. Hvert punkt repræsenterer mikrobiomet i én prøve, og afstanden mellem punkterne afspejler forskelligheden mellem prøvernes sammensætning af bakterier. Akserne viser en relativ placering af punkterne på baggrund af Bray-Curtis afstanden (akserne angiver således ikke selve Bray-Curtis afstanden, der varierer fra 0 til 1). Prøver med forurenet (trekant) og ikke forurenet (firkant) forureningsstatus er angivet med symboler. Overlappet mellem de to områder angiver de prøver, hvor påvirkningen af biodiversiteten ikke var entydig. N: Ikke-forurenet. Y: Forurenet.

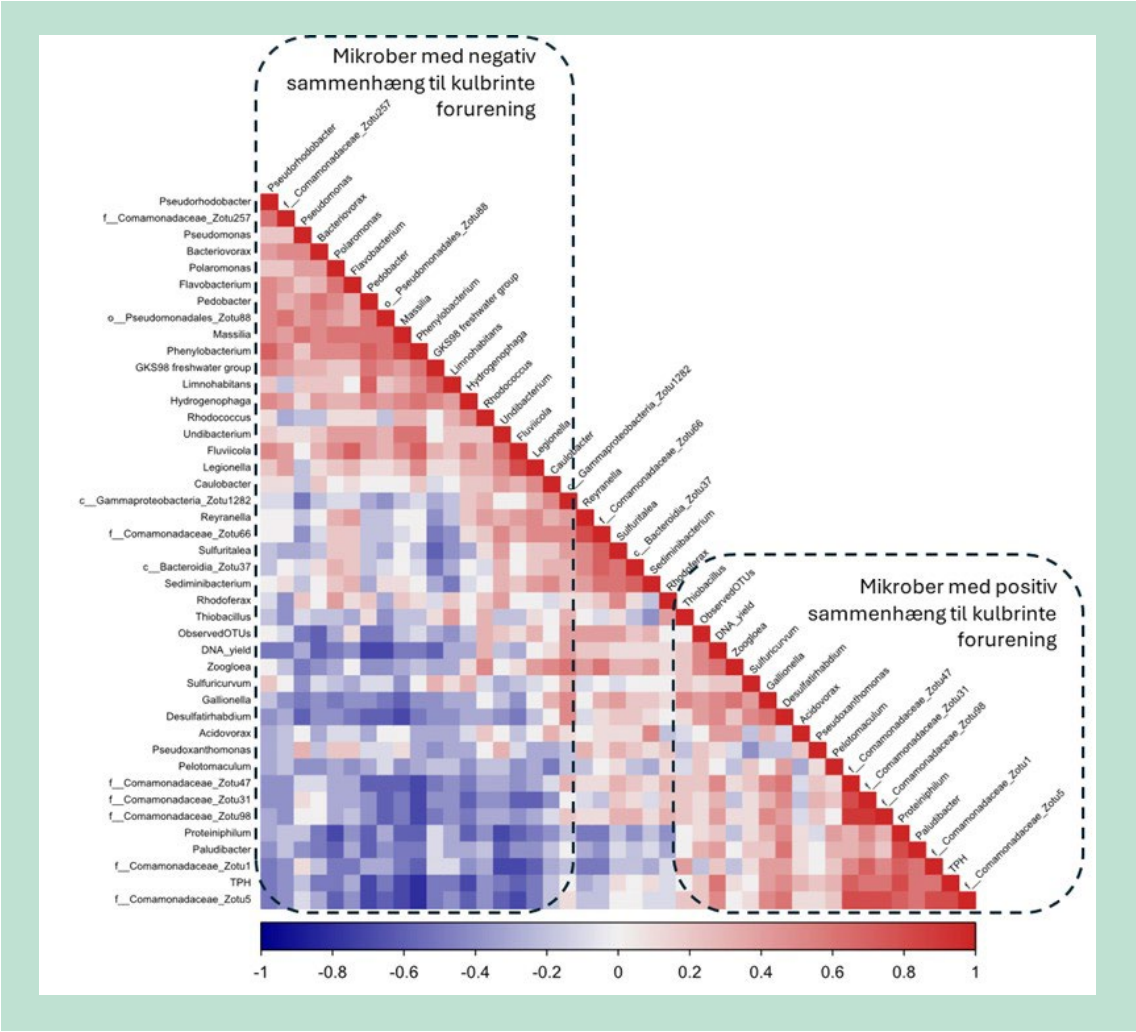
4.2.2 Sammenhæng mellem forureningsforhold og biomasse

De 40 hyppigst forekommende bakterielle taxa udgjorde 41-68 % af den samlede biomasse (figur 10). Til sammenligning blev der identificeret mere end 5.000 forskellige bakteriepopulationer i grundvandsprøverne. Flere populationer som *Acidovorax*, *Pseudomonas*, flere repræsentanter af familien *Comonadaceae* og *Sulfuritalea* forekom hyppigere i forurenede prøver, mange af disse er repræsentanter fra slægter og familier kendt for kulbrinteomsætning. Korrelationsanalyser (figur 11) identificerede 10 grupper med stærk positiv sammenhæng til kulbrinteindhold, og dermed potentiale som indikatorer for biologisk nedbrydning (tabel 4). Disse indikatorprofiler kan anvendes som støtteparametre ved kvalitativ dokumentation af naturlig nedbrydning.

Samtidigt udviste 17 mikrobielle grupper en negativ sammenhæng med kulbrinteforurening, hvilket kan afspejle følsomhed over for kulbrintepåvirkning, og dermed udgør negative indikatorarter (tabel 5).



FIGUR 10. Heatmap over de 40 hyppigst observerede bakterielle populationer på slægtsniveau i grundvandsprøver udtrykt som relativ forekomst (%) af hele den mikrobielle biomasse. Prøverne er sorteret efter lokalitet og forureningsstatus (Y=forurening og N = ikke forurening). Lokaliteter med ukendt forureningsstatus er ikke inkluderet.



FIGUR 11. Spearman's korrelationsanalyse af de 40 mest hyppigt forekommende populationer i de analyserede grundvandsprøver. Spearman's korrelationskoefficienten er udtrykt som et tal fra -1 (meget negativ korrelation) til 1 (meget positiv korrelation).

TABEL 4. Oversigt over mikrobielle populationer (slægter) med en stærk korrelation til kulbrinte forurening i grundvand.

Zooglea	*Pseudoxanthomonas*
Sulfuricurvum	*Pelotomaculum*
Gallionella	*Comamonadaceae* (familie)
Desulfatirhabdium	*Proteiniphilum*
Acidovorax	*Paludibacter*

TABEL 5. Oversigt over mikrobielle populationer med en negativ sammenhæng med kulbrinte forurening.

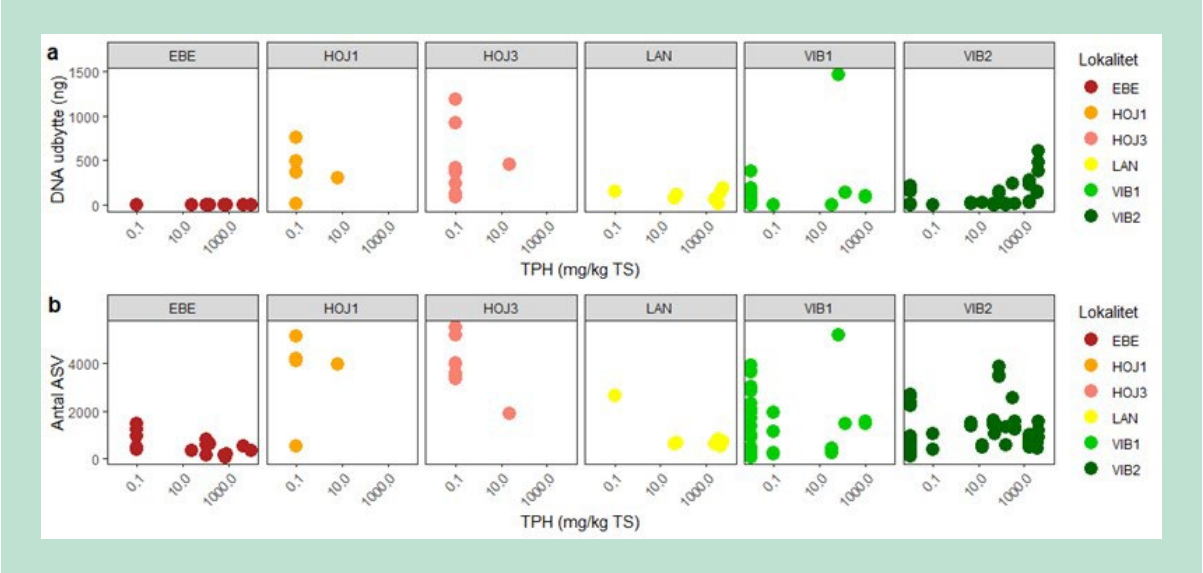
Pseudorhodobacter	*Phenylobacterium*
Comamonadaceae (familie)	*GKS98 freshwater group* (ordre)
Pseudomonas	*Limnohabitans*
Bacteriovorax	*Hydrogenophaga*
Polaromonas	*Rhodococcus*
Flavobacterium	*Undibacterium*
Pedobacter	*Fluviicola*
Pseudomonadales (ordre)	*Legionella*
Massilia	

4.3 Kulbrinteforurenet jord

Analysen omfatter 147 datapunkter fra lokaliteterne BLO, EBE, HOJ1, HOJ3, LAN, VIB1 og VIB2, og har et gennemsnit på 29.558 sekvenser per prøve og 16.414 registrerede amplikonsekvensvarianter (ASV'er).

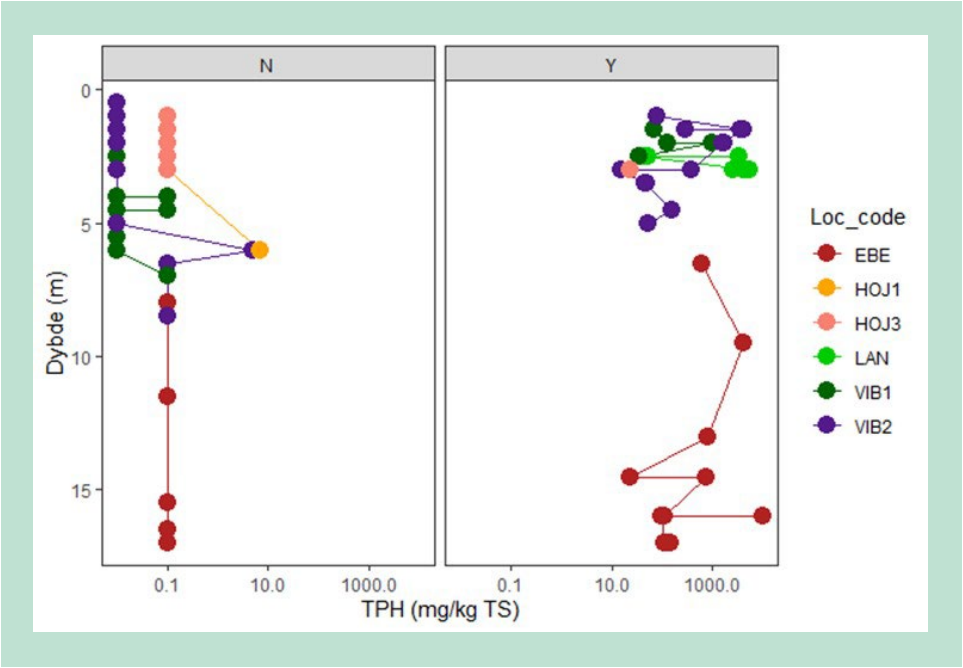
4.3.1 DNA-udbytte og diversitet

DNA-udbyttet varierede mellem 0,1 og 1.191 ng per prøve ved kulbrinteindhold (TPH) på op til 10.000 mg/kg TS. Der observeredes ingen tydelig sammenhæng mellem kulbrinteindhold og hverken biomasse (DNA-indhold) eller diversitet (figur 12).

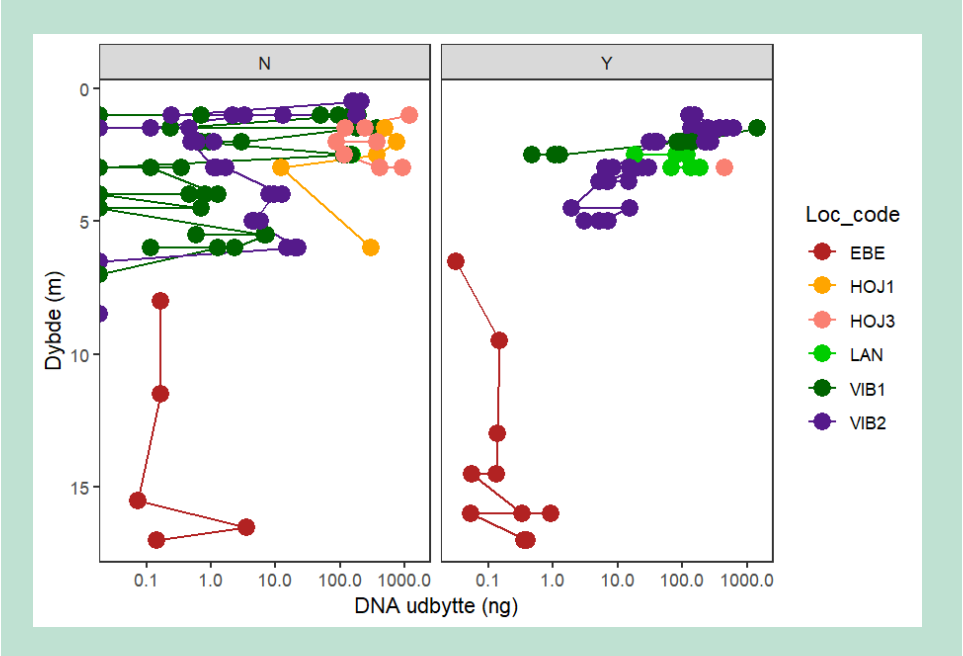


FIGUR 12. Forhold mellem TPH og DNA-udbytte (ng DNA ekstraheret fra 250 mg jord) (a) og antal ASV (b) i de analyserede jordprøver. Punkterne er farvet efter lokalitet. Der er kun inkluderet lokaliteter hvor TPH og DNA-udbyttedata var tilgængelig.

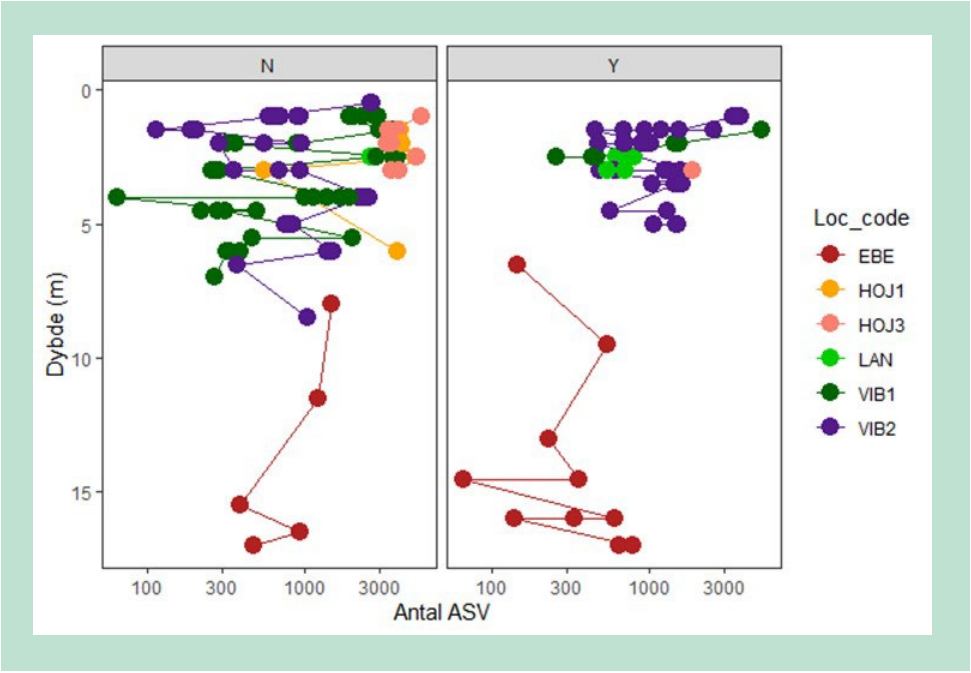
Resultatet indikerer, at der er andre forhold end kulbrinteindholdet, der spiller ind samtidigt såsom geologi eller redoxforhold. Tilsvarende sås ingen klar dybdegradient (figur 13). Dog er der en faldende tendens i mængden af ekstraherbart DNA og graden af diversitet (ASV) med prøvetagningsdybde (figur 14 og 15). Her skal det dog bemærkes, at alle jordprøver stammer fra lavorganiske jordlag, og er udtaget minimum 1 m u.t., hvilket begrænser variationen. Hvis der var analyseret jordprøver fra muldholdig overjord, ville man givetvis have fået andre resultater.



FIGUR 13. Forholdet mellem prøvetagningsdybde og totalindhold af kulbrinter (TPH) i de undersøgte jordprøver N: Ikke-forurenet prøve. Y: Forurenet prøve.

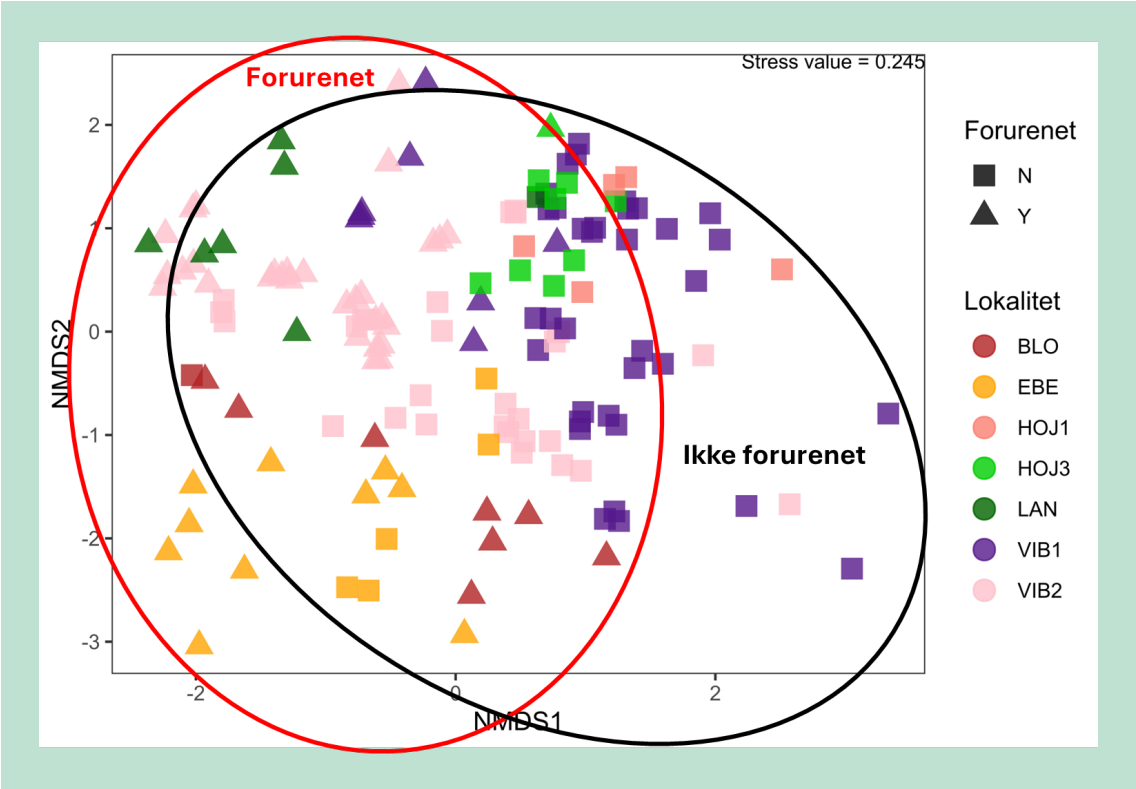


FIGUR 14. Forholdet mellem prøvetagningsdybde og DNA-udbytte (ng DNA ekstraheret fra 250 mg jord) i de undersøgte jordprøver. N: Ikke-forurenet prøve. Y: Forurenet prøve.



FIGUR 15. Forholdet mellem prøvetagningsdybde og antal observerede ASV i de undersøgte jordprøver. N: Ikke-forurenet prøve. Y: Forurenet prøve.

For at klarlægge, om der er forskelle mellem den mikrobielle sammensætning af forurenede og ikke-forurenede jordprøver, blev der udført en beta-diversitetsundersøgelse ved hjælp af en NMDS-analyse (figur 16), som er en biologisk model baseret på Bray-Curtis afstanden mellem de analyserede prøver. Bray-Curtis afstanden afspejler forskelligheden mellem to mikrobiomer (Punkter som ligger tæt på hinanden har sammenligneligt indhold).



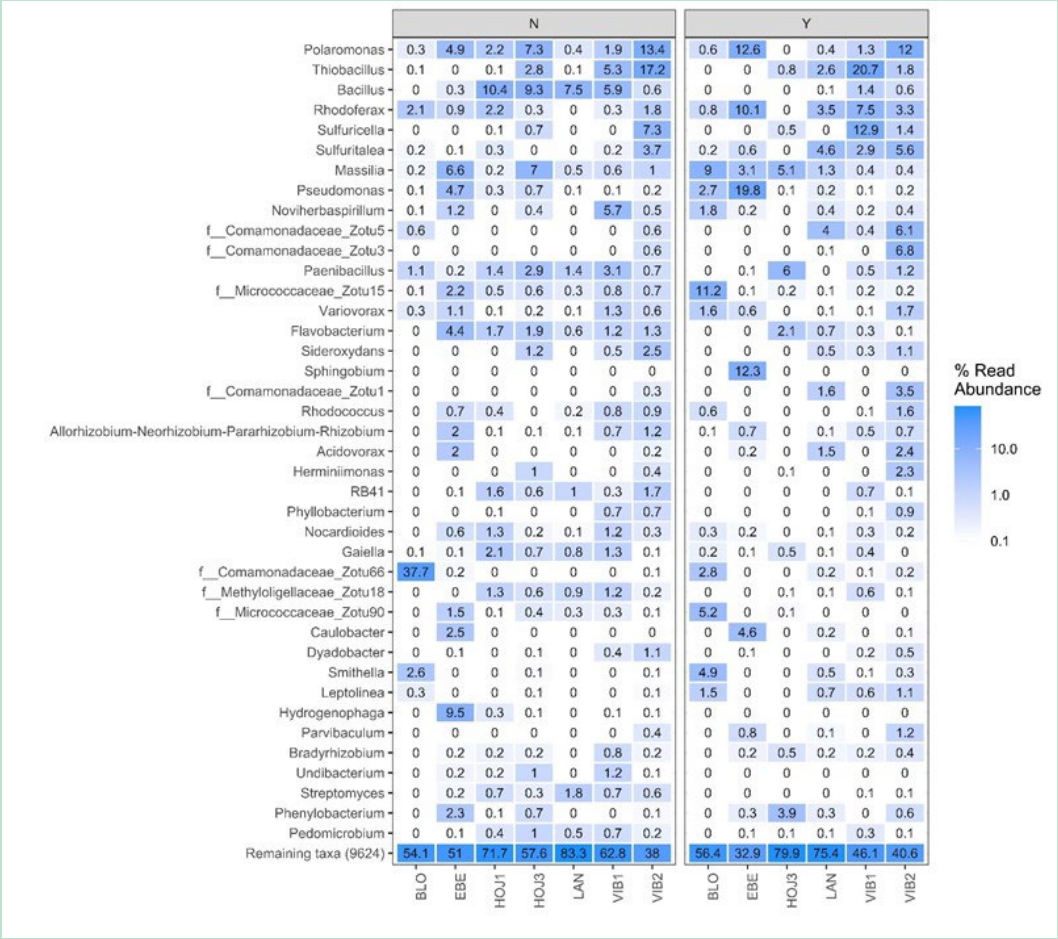
FIGUR 16. Beta diversitetsanalyse af de analyserede jordprøver. Hvert punkt repræsenterer en prøve, og afstanden mellem punkterne afspejler forskelligheden mellem de enkelte prøvers indhold. Akserne viser en relativ placering af punkterne på baggrund af deres Bray-Curtis afstande. Overlappet mellem de to områder angiver de prøver, hvor påvirkningen af biodiversiteten ikke var entydig. N: Ikke-forurenet prøve. Y: Forurenet prøve.

NMDS-analysen viste en gradueret adskillelse mellem forurenede og ikke-forurenede prøver, der dog er mindre udtalt end for grundvand (figur 9). Variationen vurderes især at hænge sammen med geologien, der varierede fra udelukkende sand på EBE til udelukkende ler på HOJ1 og HOJ2.

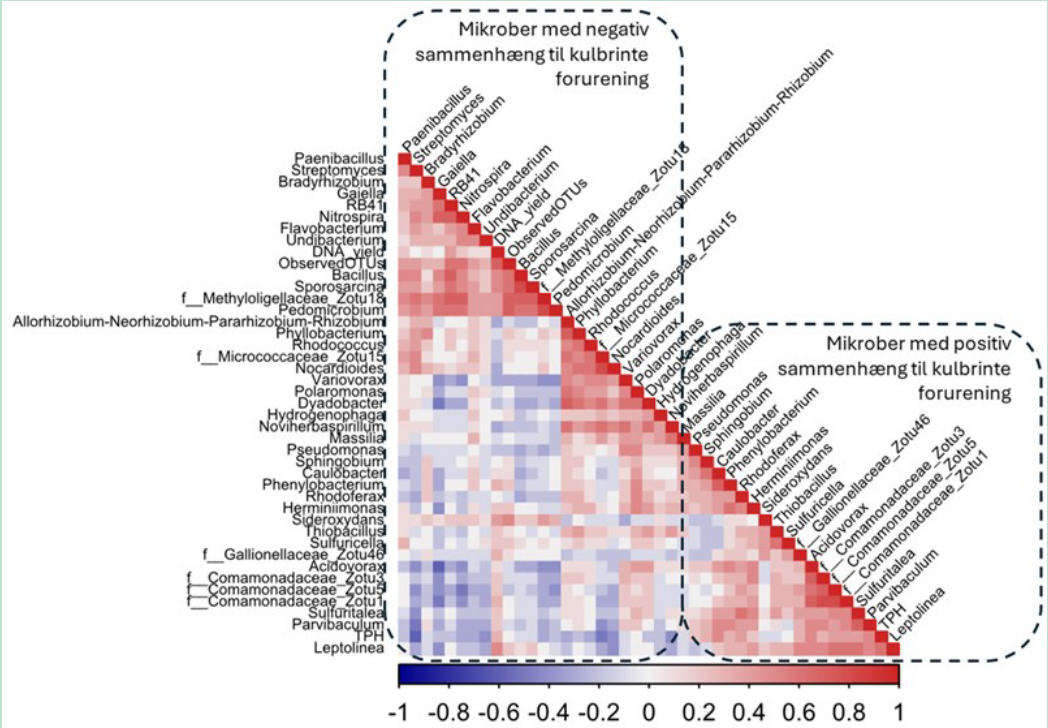
4.3.2 Indikatorpopulationer i jord

De 25 mest dominerende taxa udgjorde op til 61% af biomassen (figur 17). Til sammenligning blev der identificeret mere end 9.000 forskellige bakteriepopulationer i jordprøverne. Korrelationsanalyser identificerede 15 mikrobielle grupper med stærk positiv sammenhæng til kulbrinteindhold, hvilket tyder på deres potentielle rolle, og mulig funktion som indikatorarter for naturlig nedbrydning af kulbrinter i jord (tabel 6). Listen omfattede bl.a. *Pseudomonas*, *Rhodoferax*, *Acidovorax*, *Comamonadaceae* (familie) og *Sulfuritalea*. Flere af de positive indikatorer genfindes fra grundvandsanalyser, hvilket styrker robustheden af indikatorgrundlaget på tværs af matricer. Tilsvarende blev der også fundet 15 mikrobielle grupper med en kraftig negativ sammenhæng til kulbrinteforurening i jordprøverne (tabel 7), hvilket kunne tyde på at disse organismer kan fungere som negative indikatorarter. En korrelationsanalyse blev udført for at undersøge det statistiske forhold mellem disse populationer og forureningsgrader (figur 18).

Begge typer af indikatorpopulationer vurderes anvendelige i kvalitativ dokumentation af biologisk nedbrydning i jord.



FIGUR 17. Heatmap over de 25 hyppigst observerede bakterielle populationer på slægtsniveau i jordprøver udtrykt som relativ forekomst (%) af hele den mikrobielle biomasse. Prøverne er sorteret efter lokalitet og forureningsstatus (Y=forurening og N = ikke forurening). Lokaliteter med ukendt forureningsstatus er ikke inkluderet.



FIGUR 18. Spearman's korrelationsanalyse af de 40 mest hyppig forekommende populationer i de analyserede jordprøver, DNA udbytte, og kulbrinte indhold. Spearman's korrelationskoefficienten er udtrykt som et tal fra -1 (meget negativ korrelation) til 1 (meget positiv korrelation).

TABEL 6. Oversigt over mikrobielle populationer med en stærk korrelation til kulbrinteforurening i jordprøver.

Pseudomonas	*Thiobacillus*
Sphingobium	*Sulfuricella*
Caulobacter	*Gallionellaceae* (familie)
Phenylobacterium	*Acidovorax*
Rhodoferax	*Comamonadaceae* (familie)
Herminiimonas	*Sulfuritalea*
Sideroxydans	*Paribaculum*
Leptolinea	

TABEL 7. Oversigt over mikrobielle populationer med en negativ sammenhæng til kulbrinteforurening i jordprøver.

Paenibacillus	*Bacillus*
Streptomyces	*Sporosarcina*
Bradyrhizobium	*Methyloligellaceae* (familie)
Gaiella	*Nocardioides*
RB41 (ordre)	*Dyadobacter*
Nitrospira	*Hydrogenophaga*
Flavobacterium	*Noviherbaspirillum*
Undibacterium	

4.4 Perkolat-påvirket grundvand

Fra lokalitet LYN er der indleveret 40 grundvandsprøver til DNA-sekventering. Der er opnået et gennemsnit af 13.168 sekvenser pr. prøve, fordelt over 5.174 ASV'er.

4.4.1 Biomasse og samfundsstruktur

DNA-udbyttet varierede fra 0,1 til 2.916 ng per prøve, mens PFAS-koncentrationerne i grundvandsprøverne varierede mellem 0,01 og 130 ng/L.

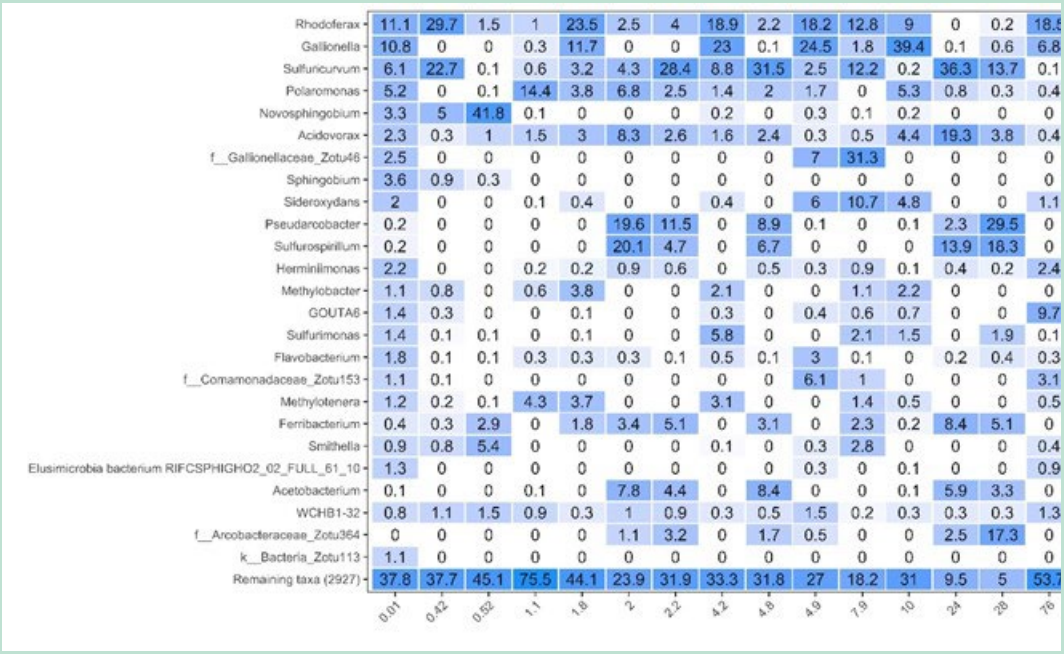
Beta-diversitetsanalyser viste ingen signifikant adskillelse af mikrobiomer baseret på PFAS-indhold. Derimod viste en PERMANOVA-analyse, samt Goodness of Fit-analyse at filterdybde ($p < 0{,}001$; $R^2 = 0{,}45$), calciumindhold ($p < 0{,}001$; $R^2 = 0{,}31$), organisk kulstofindhold ($p = 0{,}007$; $R^2 = 0{,}25$), nikkel ($p < 0{,}011$; $R^2 = 0{,}22$) og hydrogencarbonat ($p < 0{,}012$; $R^2 = 0{,}23$) havde en signifikant indflydelse på den mikrobielle sammensætning i prøverne. Det er dog alle parametre, der er knyttet til typen af de geologiske aflejringer og ikke med grundvandsforureningen.

Indholdet af PFAS (sum af 22 stoffer) i grundvandet havde ikke umiddelbart en signifikant effekt på sammensætningen af biomassen ($p < 0.171$; $R^2 = 0.10$).

4.4.2 Indikatorpopulationer

De 25 mest dominerende mikrobielle populationer i de PFAS-forurenede prøver udgjorde op til 95% af biomassen (figur 19). Flere taxa blev også fundet i kulbrinteforurenede grundvands- og jordprøver, herunder grupper associeret med redoxprocesser og organisk stofomsætning. *Rhodoferax, Gallionella*, *Sulfuricurvum*, *Acidovorax*, *Sphingobium*, *Sideroxydans*, *Herminiimonas* og *Comamonadaceae* (familie) blev identificeret som mulige indikatorer for naturlig nedbrydning på de undersøgte lokaliteter.

På det nuværende tidspunkt kan der ikke drages entydige konklusioner om biologisk nedbrydning af PFAS. Resultaterne afspejler sandsynligvis indirekte økologiske effekter frem for direkte omsætning, hvilket er i overensstemmelse med PFAS-stoffernes persistens. Det skal også nævnes, at de påviste indhold af PFAS i grundvandet var relativt lave (maks. 130 ng/l), hvilket forventes at gøre påvirkningen af mikroorganismerne begrænset.



FIGUR 19. Heatmap over de 25 mest hyppig observerede bakterielle populationer på slægtsniveau. Prøverne er sorteret efter lokalitet og PFAS-indhold.

5. Konklusion

5.1 DNA-sekventering som dokumentationsmetode

Den beskrevne metode til DNA-sekventering af jord- og grundvandsprøver er anvendt på i alt 10 forskellige testlokaliteter fordelt i Midtjylland, på Fyn og på Sjælland. Ni af lokaliteterne var forurenet med forskellige blandinger af kulbrinter, mens én lokalitet var en perkolatforurenet losseplads. Arbejdet omfattede 118 jordprøver og 100 grundvandsprøver.

Korrelationsanalyser viste signifikante sammenhænge mellem forureningsgrad og bakteriesammensætning i både jord- og grundvandsprøver. Der blev identificeret både positive og negative indikatorpopulationer. Flere af de positive indikatorer omfatter taxa kendt fra litteraturen for deres rolle i omsætning af organiske forureninger.

Sammensætningen af mikroorganismer kan dermed anvendes som kvalitativ dokumentation for biologisk aktivitet, og som støtteparameter ved vurdering af naturlig biologisk nedbrydning. DNA-analyser kan ikke anvendes til kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsrater, men kan understøtte anvendelse af konservative rater i modelberegninger i f.eks. JAGG eller GrundRisk.

Resultater af DNA-analyser kan dog ikke stå alene og skal indgå i den samlede konceptuelle model, der på grundvandssager typisk også vil omfatte geologi, jordfysiske transportparametre, strømningsforhold, potentialeforhold, aktuel forureningsudbredelse, sorption og redoxforhold. Når den konceptuelle forståelse er etableret, kan resultater fra DNA-analyserne indgå i en vurdering af f.eks. spredningspotentiale, fanestabilitet og udvikling af kildestyrken.

5.2 Anvendelse ved komplekse forureninger

Resultater fra perkolat-påvirket grundvand viste, at mikrobiomsammensætningen her i højere grad var styret af geokemiske og hydrogeologiske forhold end af de enkelte forureningsstoffer, f.eks. PFAS. Der kunne ikke påvises entydige mikrobielle responser relateret til PFAS, hvilket er konsistent med den stofgruppes persistente karakter og begrænsede biologiske nedbrydelighed i grundvandet. Desuden var indholdene af PFAS i grundvandet relativt lave.

DNA-analyser vurderes derfor primært at være egnet ved forureninger med bionedbrydelige organiske stoffer som f.eks. olie- og benzinstoffer.

5.3 Mikrobiel diversitet ved kulbrinteforurening

Udover det myndighedsrettede potentiale i DNA-metoderne, giver de også nye muligheder for at forstå mikrobielle samfund i forurenet jord og grundvand. Selvom der ofte er tale om komplekse og heterogene systemer, kan positive eller negative påvirkninger fra en række miljøfaktorer, herunder de geologiske forhold og tilgængeligheden af forureningsstoffer, aflæses i den mikrobielle sammensætning.

På tværs af lokaliteter blev der observeret en generelt højere mikrobiel diversitet i jordprøver end i grundvandsprøver. Dette afspejler forskelle i miljømæssig kompleksitet, hvor jord udgør et strukturelt og kemisk heterogent system med mange mikronicher, mens grundvandszonen fremstår mere homogen og typisk også mere næringsbegrænset.

Kulbrinteforureningerne inddraget i projektet medførte overordnet set en reduktion af den mikrobielle diversitet i både jord og grundvand. Samtidig blev der observeret en øget dominans af specifikke bakterielle grupper associeret med kulbrinteomsætning. Resultatet er konsistent med selektionsprocesser, hvor kulbrintenedbrydende bakterier favoriseres under forureningspåvirkning, mens andre arter udkonkurreres.

Ændringerne i de mikrobielle sammensætninger var mest udtalte i grundvandsprøver, hvor multivariate analyser viste en tydelig separation mellem forurenede og ikke-forurenede prøver. I jordprøver var separationen mindre markant, hvilket vurderes som en konsekvens af en højere baggrundsdiversitet og større miljømæssig heterogenitet.

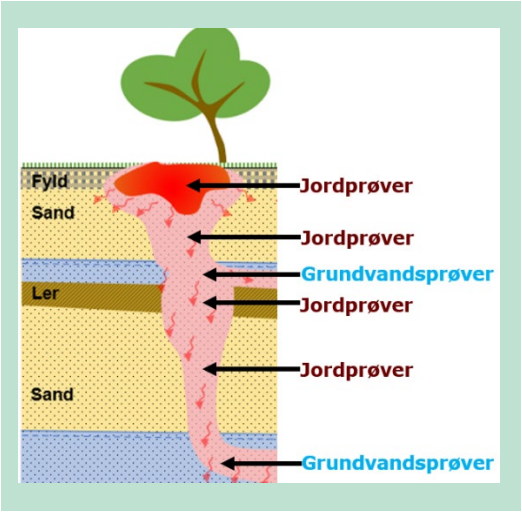
Samlet set dokumenterer analyserne, at kulbrinteforurening medfører systematiske og reproducerbare ændringer i mikrobielle samfund i både jord og grundvand.

5.4 Anbefalet prøvetagningsstrategi

DNA-analyser kan gennemføres på prøver udtaget i forbindelse med almindelige forureningsundersøgelser.

DNA-sekventering af en enkelt prøve fra jord eller grundvand er principielt tilstrækkeligt til at vurdere, om der er foregået biologisk nedbrydning af kulbrinter. For robust dokumentation anbefales dog typisk 10–20 prøver pr. lokalitet inden for samme matrice. Desuden bør der inddrages referenceprøver uden forurening for at etablere lokal baggrundsvariation. Et eksempel på en analyserapport ses i bilag 1.

Valg af prøvematrice bør desuden afspejle dokumentationsformålet. I kildeområder og umættet zone analyseres jordprøver. I grundvandsfanen analyseres grundvandsprøver. Porevandsprøver vurderes mindre egnede til DNA-analyser, idet filtrering i sugecellen kan reducere biomasseindholdet.



FIGUR 20. Anbefaling til prøvematrice ved DNA-analyser forskellige steder på en kulbrinteforurenet lokalitet.

5.5 Økonomiske forhold

DNA-analyser i dette projekt er udført af Aalborg Universitet, Center for Mikrobielle Systemer. Analyseomkostningerne for DNA-sekventering ligger typisk i niveauet 1.400-2.000 kr. ekskl. moms pr. prøve for både jord-, porevands- og grundvandsprøver. En undersøgelse med 10–20 prøver udgør dermed en relativt begrænset udgift sammenlignet med borearbejde og kemiske analyser.

Metoden fremstår derfor som et omkostningseffektivt supplement til eksisterende undersøgelsesstrategier, specielt på sager, hvor der er behov for at dokumentere, at der sker en biologisk nedbrydning af kulbrinteforurening. Derudover vil alternative undersøgelser af den biologiske nedbrydning typisk også være væsentligt større.

6. Referencer

/Albertsen et al ., 2015/ Albertsen, M., Karst, S. M., Ziegler, A. S., Kirkegaard, R. H., & Nielsen, P. H. (2015). Back to Basics – The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. Public Library of Science (PLoS). 10.1371/journal.pone.0132783

/Allen et al., 2007/ Allen, J.P., Atekwana, E.A. Atekwana, E.A, Duris, J.W.; Werkema, DD, Rossbach, S. The microbial community structure in petreolum-contaminated sediments corresponds to geophysical signatures. Applied and environmental microbiology 73, 2007

/API, 1998/ American Petroleum Institute, 1998. Characteristics of dissolved petroleum hydrocarbon plums, vers. 1.1.

/Atlas, 1981/ Atlas. R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological reviews, vol. 45, no. 1, s. 180-209, 1981.

/Arriaga et al., 2026/ Arriaga, S., de Jonge, N., Nielsen, M. L., Andersen, H. R., Borregaard, V., Jewel, K., Ternes, T. A., & Nielsen, J. L. (2016). Evaluation of a membrane bioreactor system as post-treatment in waste water treatment for better removal of micropollutants. Water Research, 107, 37–46. 10.1016/j.watres.2016.10.046

/Bahram et al., 2022/ Bahram, M., Espenberg, M., Pärn, J., Lehtovirta-Morley, L., Anslan, S., Kasak, K., Kõljalg, U., Liira, J., Maddison, M., Moora, M., Niinemets, Ü, Öpik, M., Pärtel, M., Soosaar, K., Zobel, M., Hildebrand, F., Tedersoo, L., & Mander, Ü. (2022). Structure and function of the soil microbiome underlying N2O emissions from global wetlands. Springer Science and Business Media LLC. 10.1038/s41467-022-29161-3

/Braeckevelt et al., 2012/ Braeckevelt M, Fischer A, Kästner M. Field applicability of Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA) for characterization and quantification of in situ contaminant degradation in aquifers. Appl Microbiol Biotechnol. 2012 Jun;94(6):1401-21. doi: 10.1007/s00253-012-4077-1. Epub 2012 May 11. PMID: 22573267.

/Bôto et al., 2021/ Bôto, M. L., Magalhães, C., Perdigão, R., Alexandrino, D. A. M., Fernandes, J. P., Bernabeu, A. M., Ramos, S., Carvalho, M. F., Semedo, M., Laroche, J., Almeida, C. M. R., & Mucha, A. P. (2021). Harnessing the Potential of Native Microbial Communities for Bioremediation of Oil Spills in the Iberian Peninsula NW Coast. Frontiers Media SA. 10.3389/fmicb.2021.633659

/Cabral et al., 2022/ Cabral, L., Giovanella, P., Pellizzer, E. P., Teramoto, E. H., Kiang, C. H., & Sette, L. D. (2022). Microbial communities in petroleum-

contaminated sites: Structure and metabolisms. Chemosphere, 286, 131752. 10.1016/j.chemosphere.2021.131752

/Danielsen et al., 2023/ Danielsen, A. S., Nielsen, P. H., Hermansen, C., Weber, P. L., de Jonge, L. W., Jørgensen, V. R., Greve, M. H., Corcoran, D., Dueholm, M. K. D., & Bruhn, D. (2023). Improved description of terrestrial habitat types by including microbial communities as indicators. Journal of Environmental Management, 344, 118677. 10.1016/j.jenvman.2023.118677

/Danske regioner, 2023/ Danske regioner. 2023. Bevar jordforbindelser – Regionernes arbejde med jordforurening. Maj 2023.

/de Jonge et al., 2020/ de Jonge, N., Davidsson, Å, la Cour Jansen, J., & Nielsen, J. L. (2020). Characterisation of microbial communities for improved management of anaerobic digestion of food waste. Waste Management, 117, 124–135. 10.1016/j.wasman.2020.07.047

/Dueholm et al., 2022/ Dueholm, M. K. D., Nierychlo, M., Andersen, K. S., Rudkjøbing, V., Knutsson, S., Arriaga, S., Bakke, R., Boon, N., Bux, F., Christensson, M., Chua, A. S. M., Curtis, T. P., Cytryn, E., Erijman, L., Etchebehere, C., Fatta-Kassinos, D., Frigon, D., Garcia-Chaves, M. C., Gu, A. Z., . . . Nielsen, P. H. (2022). MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. Springer Science and Business Media LLC. 10.1038/s41467-022-29438-7

/El Baz et al., 2025/ El-Baz, A.F., Shetaia, Y.M., Abdelghani, D.Y., Abou-Taleb, K.A., El-Sayed, A.S.A., Abaza, A.A. (2025). Microbial Bioremediation of Contaminated Soil. In: Shah, M.P., Deka, D. (eds) Soil Bioremediation. Environmental Science and Engineering. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-76886-6_2

/Fuentes et al., 2014/ Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). *Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications*. Springer Science and Business Media LLC. 10.1007/s00253-014-5684-9

/Hauptfeld et al., 2022/ Hauptfeld, E., Pelkmans, J., Huisman, T. T., Anocic, A., Snoek, B. L., von Meijenfeldt, F. A. B., Gerritse, J., van Leeuwen, J., Leurink, G., van Lit, A., van Uffelen, R., Koster, M. C., & Dutilh, B. E. (2022). A metagenomic portrait of the microbial community responsible for two decades of bioremediation of poly-contaminated groundwater. *Water Research, 221*, 118767. 10.1016/j.watres.2022.118767

/Hugerth og Andersson, 2017/ Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Frontiers in Microbiology, 8*, 1561. 10.3389/fmicb.2017.01561

/Kristensen, 2010/ Kristensen, A.H., 2010. Controlling factors for natural attenuation of petroleum vapors in a layered subsurface. Ph.d.-afhandling, sektion for miljøteknologi, Aalborg Universitet.

/Kristensen et al., 2013/ A. H. Kristensen, P. Loll, C. Larsen, P. S. Rank og S. G. Lauridsen. Udbredelse af gasolieforureninger i grundvandet – erfaringer fra de danske regioner. Jordforurening.info, s. 7-11, nr. 4, 2013.

/Larsen et al., 2018/ Larsen, P., Hansen, T.L., Loll, P., Larsen, C., Jonge, N. de, Nielsen, J.L. og Christensen, M. 2018. Ny metode til rutinemæssig måling af bakteriesammensætning i forurenet grundvand. Miljø & Ressourcer, 1.

/Miljøstyrelsen, 2008/ Miljøstyrelsen. Sammensætning af olie og benzin – kemiske prof ler ved brug ved risikovurdering. Miljøprojekt 1220, 2008.

/Miljøstyrelsen, 2009a/ Miljøstyrelsen. Erfaringsopsamling på udbredelsen af forureningsfaner i grundvand på villatanksager. Miljøprojekt nr. 1309, 2009.

/Miljøstyrelsen, 2012/ Miljøstyrelsen. Litteraturgennemgang af strategier til dokumentation af nedbrydning af oliestoffer i den umættede zone. Miljøprojekt nr. 1413, 2012

/Miljøstyrelsen, 2014a/ Mijøstyrelsen. 2014a. Effektive poreluftstrategier. Miljøprojekt nr. 1587, 2014.

/Miljøstyrelsen, 2014b/ Mijøstyrelsen. 2014b. Jordforureningens påvirkning af overfladevand, delprojekt 2. Miljøprojekt nr. 1565, 2014.

/Miljøstyrelsen, 2016/ Miljøstyrelsen. GrundRisk – Beregningsmodel til risikovurdering af grundvandstruende forureninger, rettet udgave., Miljøprojekt nr. 1865. 2016.

/Miljøstyrelsen, 2018/ Miljøstyrelsen. Nedbrydningsrater til brug i GrundRisk Risikovurdering – Litteraturstudie. Miljøprojekt nr. 2013, 2018.

/Miljøstyrelsen, 2021a/ Miljøstyrelsen. Nedsivning og nedbrydning af kulbrinter i moræneler – Undersøgelser med porevandsprøver og DNA-analyse af jordprøver. Miljøprojekt 2178, 2021.

/Miljøstyrelsen, 2021b/ Miljøstyrelsen. Liste over kvalitetskriterier i relation til forurenet jord - Udgave revideret for trykfejl. Opdateret juli 2021.

/Miljøstyrelsen, 2025a/ Miljøstyrelsen. Konceptuel model for transport og skæbne af PFAS ved forurenede grunde. Miljøprojekt nr. 2286. Januar 2025.

/Miljøstyrelsen, 2025b/ Miljøstyrelsen. Porevandsprøver til vurdering af grundvandsrisiko på PFAS-forurenede lokaliteter. Miljøprojekt nr. 2294. Februar 2025.

/Singleton et al., 2024/ Singleton, C. M., Jensen, T., Delogu, F., Sørensen, E. A., Jørgensen, V. R., Karst, S. M., Yang, Y., Knudsen, K. S., Sereika, M., Petriglieri, F., Knutsson, S., Dall, S. M., Kirkegaard, R. H., Kristensen, J. M., Woodcroft, B. J., Speth, D. R., Aroney, S., , Wagner, M., . . .

Albertsen, M. (2024). Microflora Danica: the atlas of Danish environmental microbiomes. bioRxiv, , 2024.06.27.600767. 10.1101/2024.06.27.600767.

/Singleton et al., 2026/ Singleton, C.M., Jensen, T.B.N., Delogu, F. et al. The Microflora Danica atlas of Danish environmental microbiomes. Nature 649, 971–981 (2026). https://doi.org/10.1038/s41586-025-09794-2

/Sogin et al., 2006/ Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 12115–12120. doi: 10.1073/pnas.0605127103

/Thompson et al., 2017/ Thompson, L. R., Sanders, J. G., Mcdonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., Navas-Molina, J. A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J. T., Mirarab, S., Zech Xu, Z., Jiang, L., . . . Zhao, H. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. Springer Science and Business Media LLC. 10.1038/nature24621

/Turnbaugh et al., 2007/ Turnbaugh, P., Ley, R., Hamady, M. *et al.* The Human Microbiome Project. *Nature* **449**, 804–810 (2007). https://doi.org/10.1038/nature06244

/Yashiro, 2023/ Yashiro, E. AmpProc 5.1 pipeline - Illumina sequenced amplicon reads processing workflow. Github. Retrieved 01-11-2024, from https://github.com/eyashiro/AmpProc

Bilag 1. Eksempel på DNA-analyserapport

Analyserapport – DNA-sekventering

Rekvirent	-
Kontaktperson	-
Mobil	-
E-mail	-
Lokalitetsnr. og -navn	-

Analysearbejdet er udført af Aalborg Universitet, Center for Mikrobielle systemer. DNA-sekventeringen er udført som beskrevet i reference A og B. Konklusionen af DNA-sekventeringen angiver om sammensætningen af prøvens biomasse vurderes at være ændret som følge af naturlig biologisk nedbrydning af forurening. Ved analysearbejdet sammenlignes med en database af resultater fra sekventering af prøver fra danske lokaliteter forurenet med olie- og benzinprodukter. Databasen udvides løbende, hvorfor grundlaget for vurdering af DNA-resultaterne ligeledes forbedres over tid. Forureningskoncentration (jord/vand) samt oplysninger om jordtype, prøvetagningsdato og dybde er oplyst af rekvirenten.

Boring	Jordtype	Dato for prøvetagning	Dybde	Jord, C_6-C_{35}	Naturlig nedbrydning[A]
		dd-mm-åå.	m.u.t.	mg/kg TS	Ja/Nej/ Ikke entydig
B101	Sand	12-05-21	8,0	i.p.	Nej
	Sand	12-05-21	10,5	**2.200**	Ja
	Sand	12-05-21	13,0	**790**	Ja
	Sand	12-05-21	14,5	**760**	Ja
	Sand	12-05-21	16,0	**110**	Ikke entydig
	Sand	12-05-21	17,0	i.a.	Nej
B102	Sand	12-05-21	11,5	i.p.	Nej
	Sand	12-05-21	14,5	24	Nej
B103	Sand	22-05-21	6,5	**610**	Ja
	Sand	22-05-21	9,5	**4.300**	Ja
	Sand	22-05-21	11,0	**110**	Nej
	Sand	22-05-21	12,0	**720**	Ja
	Sand	22-05-21	16,0	**100**	Nej
B104	Sand	22-05-21	15,0	i.p.	Nej
	Sand	22-05-21	16,0	**10.000**	Ja
	Sand	22-05-21	17,0	**150**	Nej
B105	Grus	12-05-12	16,5	i.p.	Ikke entydig
B108	Sand	22-05-21	11,5	i.p.	Nej
	Sand	22-05-21	14,0	i.p.	Nej
	Sand	22-05-21	15,5	i.p.	Nej
	Sand	22-05-21	17,0	i.p.	Ikke entydig

Tabel 1: Konklusion af DNA-sekventering af jordprøver sammenholdt med resultater af kulbrinteanalyser samt oplysninger om jordtype, dybde mm.

Prøve	Prøvetype	Dato for prøvetagning	Dybde	Jord, C_6-C_{35}	Naturlig nedbrydning[B]
		dd-mm-åå.	m.u.t.	mg/kg TS	Ja/Nej/ Ikke entydig
B18	Grundvand	14-06-21	15-17	i.p.	Ja
B23	Grundvand	14-06-21	15-17	**930**	Ja
B101	Grundvand	14-06-21	14-17	i.p.	Nej
B102	Grundvand	14-06-21	14,7-17,7	i.p.	Nej
B105	Grundvand	14-06-21	14-17	<	Nej
B108	Grundvand	14-06-21	14-17	<	Nej

Tabel 2: Konklusion af DNA-sekventering af vandprøver sammenholdt med resultater af kulbrinteanalyser og oplysninger om dybde mm.

Referencer

A Miljøstyrelsen, 2021. Nedsivning og nedbrydning af kulbrinter i moræneler – Undersøgelser med porevandsprøver og DNA-analyse af jordprøver. Miljøprojekt nr. 2178, september 2021.

B Larsen, P., Hansen, T.L., Loll, P., Larsen, C., Jonge, N. de, Nielsen, J.L. og Christensen, M. 2018. Ny metode til rutinemæssig måling af bakteriesammensætning i forurenet grundvand. Miljø & Ressourcer, nr. 1.

Resumé
Mange ejendomme er kortlagt på baggrund af olie- og benzinforurening (kulbrinter). Denne type forurening er kendt for generelt at blive nedbrudt af naturlige mikroorganismer. Hidtil har det dog været vanskeligt at dokumentere nedbrydningen for en konkret lokalitet.

Rapporten beskriver en DNA-baseret metode til kvalitativ dokumentation for naturlig nedbrydning af kulbrinter i jord og grundvand. Metoden omfatter DNA-sekventering af prøver fra det forurenede område samt referenceprøver fra uforurenede områder på samme lokalitet.

I forbindelse med projektet er der analyseret 118 jordprøver og 100 grundvandsprøver, der primært er udtaget fra kulbrinteforurenede lokaliteter. Resultaterne viser signifikante forskelle mellem sammensætningen af bakterier i hhv. forurenede og uforurenede prøver. Der blev identificeret både positive og negative indikatorpopulationer, der vurderes at afsløre, om naturlig nedbrydning har fundet sted i den pågældende prøve.

Den beskrevne metode vurderes at være et brugbart værktøj på lokaliteter, hvor risikovurderingen baseres på naturlig nedbrydning i f.eks. JAGG eller GrundRisk, og hvor man ønsker lokalitetsspecifik dokumentation for at nedbrydningen finder sted.

Miljøstyrelsen
Lerchesgade 35
5000 Odense C

www.mst.dk