

Avancerede molekylærbiologiske metoder til dokumentation af naturlig nedbrydning

Af Per Loll og Claus Larsen, Dansk Miljørådgivning A/S, Poul Larsen, Aalborg Universitet, Sektion for Bioteknologi og Anders Riiber Høj, Oliebranchens Miljøpulje

I denne artikel sætter vi fokus på anvendelse af to nye molekylærbiologiske metoder. Metoderne er, i samarbejde med Oliebranchens Miljøpulje, benyttet til påvisning af naturlige nedbrydere og dokumentation af nedbrydningsaktivitet for MTBE på to lokaliteter med MTBE-faner i grundvandet.

I 2009 udgav Videncenter for Jordforurening et web-baseret katalog over "Projekteringsparametre for afværgelse" som støtteværktøj til "Afværgeskataloget" /1/. I kataloget over projekteringsparametre indgår afværgesparameteren "Specifikke nedbrydere" /2/, der med fordel kan undersøges allerede på et tidligt tidspunkt i et sagsforløb, som kan ende med at gå til afværgelse. Siden udgivelsen af afværgeskataloget har der i international sammenhæng været stigende fokus på udvikling og anvendelse af nye molekylærbiologiske metoder til at påvise potentiale for nedbrydning og til at dokumentere *in-situ* naturlig nedbrydning i grundvandet på forurenede lokaliteter, f.eks. /3, 4/.

Problemstillingen

I dansk risikovurderingskontekst kræves det som udgangspunkt, at nedbrydning kun inddrages i en risikovurdering udført med JAGG-modellen, hvis "undersøgelsesfasen har vist, at redoxforholdene giver mulighed for nedbrydning af de aktuelle forureningskomponenter" /5/. Dertil kræves det, at den lokalitetsspecifikke nedbrydningsrate kan kvantificeres via feltmålinger, hvor "prøvetagnings- og monitoringsboringer kan placeres optimalt (såvel vertikalt som horisontalt) i forureningsfanen og på en strømline nedstrøms forureningsfanen" /5, 6/. Hvis disse betingelser er opfyldt kan nedbrydning inddrages i risikovurderinger med JAGG-modellens trin 3.

Denne tilgang er dog ofte meget besværlig, og på komplicerede sager kan det i praksis ofte være umuligt at påvise og dokumentere en naturlig nedbrydningsaktivitet i grundvandet via ovenstående tilgang. Dette fordi der under komplicerede, danske geologiske forhold kræves et meget stort antal filtre for at ramme fanens midtpunkt både vertikalt og horisontalt, og fordi det ofte er praktisk umuligt at placere en boring præcist, hvor man ønsker pga. bygninger, veje og ledninger m.v.

Dertil regnes MTBE som en vanskeligt nedbrydelig/ikke-nedbrydelig forureningskomponent, hvorfor der ikke umiddelbart kan forventes at foregå nedbrydning /5, 6/. Siden udgivelsen af /5, 6/ i 1998 har flere studier (f.eks. /7, 8/) dog påvist, at nedbrydning af MTBE ikke er så sjælden som antaget i forrige årtusinde, specielt under aerobe forhold.

De anvendte metoder

Til undersøgelse af den mikrobielle nedbrydning af MTBE i forureningsfanerne på to OM-sager er der udført to typer af molekylærbiologiske analyser: (I) qPCR-analyser for tilstedeværelse af mikroorganismen *Methylobium petroleiphilum* PM1, og dermed potentiale for nedbrydning, samt (II) SIP-PLFA-analyser til dokumentation af, at der foregår en aktiv nedbrydning i grundvandet omkring borerne. Prøverne er analyseret ved Microbial Insights i USA.

qPCR /2, 4/

qPCR står for quantitative Polymerase Chain Reaction. qPCR er en DNA-metode, der fortæller, hvor mange gensekvenser/celler der er til stede i en vand- eller jordprøve. Gensekvensen kan f.eks. være specifik for en bestemt mikroorganisme eller for evnen til at producere et bestemt enzym. I dette tilfælde undersøges for PM1, der er en kendt aerob primær nedbryder af MTBE. Tilstedeværelse af PM1 er et udtryk for, at der er potentiale for MTBE-nedbrydning - ikke nødvendigvis, at MTBE nedbrydes.

SIP-PLFA /3, 4/

SIP står for Stable Isotope Probing. Ved den konkrete anvendelse er ¹³C-mærket MTBE tilsat såkaldte BioTraps™ (en baited BioTrap™). ¹³C er en stabil kulstof-isotop, som indbygges i den aktive biomasse som følge af nedbrydning, samt i CO² efter total nedbrydning (mineralisering) af MTBE. Resultatet gives som antal celler, der har indbygget ¹³C, som kan sammenlignes med totalt celleantal, ligesom det anføres, hvor meget biomasse og uorganisk kulstof der er beriget med ¹³C. Aktuelle værdier sammenlignes med erfaringsværdier for en semi-kvantitativ vurdering af MTBE-nedbrydningen.

PLFA står for Phospholipid Eatty Acid, der er en primær komponent i cellevæggen på levende mikroorganismer. Når mikroorganismene dør, bliver PLFA hurtigt nedbrudt, hvorfor indholdet er et godt udtryk for levende biomasse. PLFA-analyse er en såkaldt fingeraftrykmetode, hvor sammensætningen af fosfolipider afspejler, hvilke funktionelle grupper, der er til stede i prøven, f.eks. jern-, eller sulfatreducerende organismer.

Til qPCR-analyserne udtages der en vandprøve ved kontrolleret vandprøvetagning til stabile niveauer af ilt, temperatur, ledningsevne og pH. Efter renpumpning udtages prøven ved at filtrere 1-2 L grundvand igennem et specialfilter fremsendt af analyselaboratoriet.

Til SIP-PLFA-analyserne fremsender analyselaboratoriet sterile baited BioTraps™ /9/, der er små slidsede plasticfiltre indeholdende kompositperler – såkaldte BioSep®-perler. BioSep®-perlerne er porøse og har et meget stort indvendigt overfladeareal, som mikroorganismene kan kolonisere. Samtidig kan perlerne imprægneres med et relevant ¹³C-mærket substrat, som man vil undersøge nedbrydningen af, i dette tilfælde MTBE. BioTrap™-filtrene har været installeret i ca. 30 dage i midten af de undersøgte miljøfiltre.



Filtre til qPCR-analyse



BioTraps™ tilsat ¹³C-mærket MTBE

De konkrete lokaliteter

Ovenstående analysetyper er udført på grundvandsprøver fra to OM-lokaliteter beliggende i hhv. Ølstykke og Saltum. De to lokaliteter beskrives kort i det følgende. I Ølstykke har der frem til 1995 været solgt benzin, og det er konstateret, at lækket benzin indeholdende MTBE har spredt sig til terrænnære lommer af sekundært grundvand og til umættet zone (moræneler og -sand). Der er konstateret nedsivning til det primære magasin, som ligger i kalk ca. 16-17 meter under terræn, og der er konstateret overskridelse af Miljøstyrelsens grundvandskvalitetskriterium for MTBE i boreriger placeret op til 140 meter nedstrøms kildeområdet. I flere boreriger i MTBE-fanen er der konstateret relativt høje indhold af TBA (nedbrydningsprodukt af MTBE), som vurderes at kunne være relateret til nedbrydning af MTBE. Desuden har isotopfraktioneringsanalyser (Compound Specific Isotope Analysis - CSIA) vist en svagt stigende ¹³C-/¹²C-isotopratio i den nedstrøms del af fanen – hvilket vurderes at kunne være et tegn på, at der foregår nedbrydning af MTBE i det primære magasin – på trods af, at der er anaerobe redoxforhold i magasinet.

I Saltum har der frem til 2002 været solgt benzin, og det er konstateret, at lækket benzin indeholdende MTBE har spredt sig til sekundært grundvand. Sagen har en meget kompliceret geologi med op til tre hydraulisk adskilte sekundære magasiner overliggende et kalkmagasin med trykniveau ca. 22 meter under terræn. I sekundært grundvand er

der konstateret overskridelse af Miljøstyrelsens grundvandskvalitetskriterium for MTBE i borerer placeret op til 25 meter nedstrøms kildeområdet. I flere borerer i MTBE-fanen er der konstateret relativt høje indhold af TBA, som vurderes at kunne være relateret til nedbrydning af MTBE – på trods af, at der er anaerobe redoxforhold.

På baggrund af MTBE's mulige indhold af TBA som teknisk urenhed samt kalkens dobbeltporøse karakter, der potentielt kan påvirke MTBE's isotopsignatur i samme retning som nedbrydning, er der ingen af ovenstående indicier, der kan tages som entydigt bevis på, at der foregår en *in-situ* nedbrydning af MTBE i kalkmagasinet.

Resultater

På de to sager er der udvalgt hhv. 5 (Ølstykke) og 3 (Saltum) grundvandsfiltre, hvorpå de omtalte molekylærbiologiske analyser udføres. På begge sager er der udvalgt filtre nedstrøms i MTBE-fanen, hvor der ikke er påvist betydende indhold af andre kulbrinter, inkl. BTEX, og hvor gentagne analyser har vist forholdsvis høje indhold af TBA. Med andre ord er der udvalgt miljøfiltre placeret i grundvand, hvor der er en formodning om MTBE-nedbrydende aktivitet.

Resultaterne af qPCR-analyserne for indhold af den specifikke MTBE-nedbryder PM1 i vandprøver fra udvalgte filtre fremgår af nedenstående tabel sammen med konstaterede middelniveauer af MTBE og TBA.

Som det fremgår af tabellen, er der konstateret indhold af PM1 i samtlige udtagne grundvandsprøver undtaget i prøven fra filter A i Ølstykke, som havde det laveste niveau af både MTBE og TBA. I de filtre, hvor der er konstateret PM1, er der konstateret mellem 3.500 og 108.000 celler/L. Med andre ord er der påvist gener tilhørende en specifik MTBE-nedbrydende mikroorganisme i de pågældende filtre, men det er endnu ikke konstateret om biomassen er aktiv ift. *in-situ* nedbrydning af MTBE under de gældende anaerobe redoxforhold, som umiddelbart ikke er optimale ift. nedbrydning af MTBE.

	Filter	MTBE (µg/L)	TBA (µg/L)	PM1 (celler/L)
Ølstykke	A	11	0,82	< 600
	B	72	2,6	11.000
	C	30	3,4	66.000
	D	48	1,9	3.500
	E	37	1,4	55.000
Saltum	A	570	4,6	15.700
	B	240	3,1	63.900
	C	520	4,9	108.000

Vi har ikke været i stand til at finde ret mange referencepunkter ift. *in-situ* indhold af PM1 i grundvand i litteraturen, men i en undersøgelse af en aerob akvifer i USA, hvor MTBE-koncentrationen var noget højere end i Ølstykke, men på niveau med de højeste indhold i Saltum (> 500 µg/L), er der i aerobe zoner konstateret indhold på omkring 150.000 celler/L, og under detektionsgrænsen i anaerobe zoner /10/. Desuden er resultaterne i tabel 1 på niveau med resultaterne opnået for dehalococcoides i et aktivt kildeområde på en grund udvalgt til reduktiv dechlorering /11/.

På baggrund af resultaterne i tabel 1 er der efterfølgende installeret BioTraps i samtlige filtre, undtaget filter A i Ølstykke, hvorefter der er udført SIP-PLFA-analyser på de indsendte prøver.

Det mikrobiologiske laboratorium har konkluderet følgende omkring MTBE-nedbrydning for de undersøgte filtre ud fra SIP-PLFA-resultaterne:

- ^{13}C i opløst uorganisk kulstof indikerer en signifikant, men lav MTBE-mineralisering, dvs. nedbrydning hele vejen til CO_2 .
- ^{13}C -indbygning i biomasse indikerer, at der foregår en nedbrydning af MTBE. Nedbrydningsaktiviteten er karakteriseret som "lav".
- Resultaterne indikerer, at der er sket en begrænset MTBE-nedbrydning i de undersøgte borer, mens BioTraps har været installeret.
- Mikroorganismene er antalmæssigt domineret af actinomyceter og proteobakterier, hvor relativt høje antal er karakteristiske for hhv. sulfat- og jern-reducerende forhold og for kulbrintenedbrydende mikroorganismer.

Konkrete vurderinger

På baggrund af de mikrobiologiske analyser vurderes det sammenfattende, at der forekommer gener tilhørende en kendt aerob MTBE-nedbryder, PM1, hvilket kraftigt indikerer, at der er et potentiale for nedbrydning af MTBE i de undersøgte filtre.

Dertil er det konstateret, at der forekommer såvel en indbygning af ^{13}C -mærket kulstof i bakterie-biomasse samt en mineralisering (udvikling af ^{13}C -mærket CO_2) i grundvandet omkring de undersøgte filtre. Analyselaboratoriet har for alle filtre karakteriseret nedbrydningsaktiviteten som værende i den lave ende (ift. erfaringsværdier), hvilket dog ikke er overraskende set i lyset af de anaerobe forhold i magasinet og de relativt lave MTBE-niveauer.

Via de nye molekylærbiologiske undersøgelsesmetoder er der således påvist en aktuel nedbrydningsaktivitet i grundvandet på lokaliteterne, og resultaterne underbygger tidligere resultater, hvor der var indikationer på, at der foregår naturlig nedbrydning af MTBE i grundvandet på begge lokaliteter. Resultaterne er opnået på trods af, at der er tale om MTBE-faner i "vanskelige geologier", hvor det med traditionelle metoder vil være umuligt eller meget besværligt og omkostningstungt at dokumentere *in-situ* nedbrydningsaktivitet.

Det er også værd at bemærke, at det er dokumenteret, at der er aktuel (lav) nedbrydningsaktivitet, selvom begge magasiner er karakteriseret som anaerobe, dvs. hvor der ikke er gunstige redoxforhold, for at en nedbrydning kan forventes at finde sted. Dokumentationen er dog kun semi-kvantitativ (der er ikke bestemt en nedbrydningsrate), hvorfor den ikke direkte kan lægges til grund for en risikovurdering via JAGG-modellens trin 3 med nedbrydning. Resultaterne vurderes dog at være egnede til at nuancere øvrige vurderinger i sagerne.

Overordnede vurderinger og perspektiver

Avancerede molekylærbiologiske analysemetoder giver nu mulighed for at undersøge potentialet for naturlig nedbrydning i grundvand samt for at tilvejebringe kvalitativ dokumentation for *in-situ* nedbrydning på en omkostningseffektiv måde. Det nye er, at der er tale om dokumentation for *in-situ* nedbrydning - og ikke bare indicier.

Fremadrettet ser DMR et stort potentiale for på en økonomisk overkommelig måde at løfte nedbrydningsmæssige problemstillinger ift. vores risikovurderinger ved hjælp af nye mikrobiologiske metoder. Dertil er udviklingen af nye molekylærbiologiske teknikker i rivende fremdrift, og det vurderes, at der inden for de næste 5-10 år vil ske væsentlige landvindinger, som kan være med til at ændre den måde, hvorpå naturlig nedbrydning inddrages i vores risikovurderinger.

Da metoderne er forholdsvis billige vurderes det, at nye molekylærbiologiske metoder har stort potentiale ift. tidlig inddragelse i et sagsforløb på komplicerede sager til påvisning af eventuel naturlig nedbrydning eller potentiale for stimuleret nedbrydning, som kan inddrages i eventuelle afværgeplaner – helt i tråd med intentionerne for VJ's afværgekatalog /1, 2/.

Herunder ser vi klart et perspektiv i at kunne dokumentere nedbrydning i grundvandet kvalitativt, for efterfølgende at inddrage en konservativ nedbrydningsrate i risikovurderingen samt en monitoring rettet mod en dokumentation af, at fanen ikke flytter sig ud over den beregnede afstand. En sådan tilgangsvinkel ville i øvrigt være i tråd med den strategi, som er anlagt ift. inddragelse af naturlig nedbrydning i den umættede zone i JAGG 2.0, jf. /12/.

Afslutningsvist kan det oplyses, at DMR indgår i et udviklingsamarbejde med Teknologisk Institut, der er rettet imod at udvikle og tilbyde avancerede mikrobielle analyseprodukter over for en række forureningskomponenter og problemstillinger til brug på det danske marked.

Referencer

- /1/ <http://jordforurening.info/afvaergekatalog.php>
- /2/ http://jordforurening.info/afvaerger/parameter_udskriv.php?id=11
- /3/ Using Stable Isotope Probing and Bio-Traps™ to Demonstrate the In Situ Biodegradation Potential of Contaminants in Groundwater. K. Sublette m.fl. Præsentation C-28 på Battelle-konference om Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, 2011
- /4/ Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets. ITRC Technology Overview EMD-1. Interstate Technology and Regulatory Council. Washington DC, november 2011
- /5/ Oprydning på forurenede lokaliteter – Hovedbind og Appendikser. Miljøstyrelsens Vejledning nr. 6 og 7, 1998
- /6/ Naturlig nedbrydning af miljø-fremmede stoffer i jord og grundvand. Miljøprojekt 408, 1998
- /7/ MTBE nedbrydning i danske grundvandssedimenter. P. Loll, K. Henriksen, L. Bjergbæk, S. Mogensen og C. Larsen. Vand & Jord. 10(1), s. 13-16, 2003
- /8/ MTBE Biodegradation in the Vadose Zone. P. Loll, D. Nørgaard, K. Henriksen og C. Larsen. Paper C-38 på Battelle-konference om In Situ and On-Site Bioremediation i Baltimore, Maryland, 2007
- /9/ <http://www.microbe.com/bio-trap-samplers.html>
- /10/ Naturally occurring bacteria similar to the methyl tert-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater. K. Hristova, B. Gebreyesus, D. Mackay og K.M. Scow. Appl. Environmental Microbiol.69(5):2616-23, 2003
- /11/ Forundersøgelser til pilotprojekt om reduktiv dechlorering. Miljøprojekt 1146, 2007
- /12/ Opgradering af JAGG til version 2.0: Umættet zone – hvad kan JAGG nu? A.G. Christensen, P. Kjeldsen, P. Binning og M. Troldborg. Præsentation ved ATV-møde: JAGG med "face lift" og større motor. 16. juni 2010