

Biologisk nedbrydning af kulbrinter med særlig henblik på olieforurening

Ved T. Vincents Nissen

910. beretning fra Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Nærværende beretning er et led i undersøgelserne over den mikrobielle sønderdeling af kulbrinter i jord ved Statens Planteavls-Laboratoriums bakteriologiske afdeling. Den omhandler dels en oversigt over den biologiske nedbrydning af kulbrinter med særlig henblik på olieforurening, dels nogle orienterende undersøgelser over den biologiske bestandighed af de såkaldte *weedkiller oils* i jord. Undersøgelserne er ledet og beretningen udarbejdet af afdelingsbestyrer, mag. scient. T. Vincents Nissen. De kemiske undersøgelser er foretaget af akademiingeniør Anne-Margrethe Lind med velvillig assistance af lektor, civilingeniør Åge Jart, Danmarks tekniske Højskole. Ved de biologiske forsøg har laborant Anna-Lise Hansen medvirket.

Forstanderne ved Statens Forsøgsvirksomhed i Plantekultur

Indledning

Olie- og gasforekomsterne antages at have biologisk oprindelse. Kulbrinterne formodes dannet ved, at organisk materiale – i stærkt reducerende omgivelser – langsomt er blevet relativt rigere på brint og fattigere på ilt. Bag oliens dannelse står antagelig også fysiske kræfter, især indvirkning af høje tryk gennem lange tidsrum. Der er dog også fremsat den hypotese, at visse marine bakterier direkte kan have produceret kulbrinter af højere orden, som en del af deres cellesubstans.

Verdensforbruget af mineralolie er stærkt stigende. I 1966 angaves en årlig udskibning af 700 millioner tons olie, men olieforbruget forventes i 1980 at stige til det femdobbelte. Olieforureningen er allerede nu et betydeligt problem. I de kommende år vil olieforurening blive en økologisk faktor, dels direkte på grund af oliespild, dels indirekte, ved luftforurening som følge af forbrænding – og ved udbredt anvendelse af mange teknisk fremstillede, vanskeligt nedbrydbare oliederivater.

Mikrobiologien har længe beskæftiget sig med mikroorganismers forhold til kulbrinter, af teoretiske grunde og af hensyn til muligheden for teknisk udnyttelse ved oliesøgning. I de senere år er hertil føjet forskning over anvendelse af olie som substrat for mikroorganismer med fødeproduktion for øje og undersøgel-

ser over mikroorganismers nedbrydning af olie efter forurening af jord og vand. Nærværende oversigt er baseret på et udvalg af den nyere litteratur, med særligt henblik på *olieforurening af vand og jord*.

1. Om kulbrinter

Kulbrinter er kemiske forbindelser af kulstof og brintatomer. Kulbrinter kan være *luftarter* (eks. methan), *flydende* (eks. hexan) eller *faste* (eks. paraffin). Kulstofatomerne kan være indbyrdes forbundet i en lige kæde, i en grenet kæde, eller i en ring. Bærer kulstofatomerne den fulde besætning af brintatomer, er de *mættede*. Med mindre brint er nærliggende kulstofatomer forbundet med to eller tre bindinger i stedet for een. Sådanne kulbrinter benævnes *umættede* og er mere ubestandige og kemisk mere reaktionsdygtige end mættede kulbrinter. Kulbrinter, der afledes fra methan, kaldes *alifatiske*. Ringforbindelser med een eller flere seksleddede ringe med tre skiftevis anbragte dobbeltbindinger kaldes *aromatiske* (fordi de fleste af dem har en karakteristisk lugt). Erstatte brintatomer med kulbrintegrupper, eller indføres ilt, nitrogen, svovl, chlor eller andre grundstoffer i molekylet, opstår nye stoffer med særlige egenskaber. Der er derfor eksistens og *mulig* eksistens af et vældigt antal stoffer ud fra kulbrinteskelettet.

Råolie er en blanding, varierende efter oprindelse, af flydende kulbrinter med faste og luftformige kulbrinter i opløst tilstand. I råolie findes ofte små mængder af andre kemiske forbindelser. Disse stoffer er i mange tilfælde skadelige og må fjernes ved oliens raffinering. Men enkelte er gavnlige og fjernes derfor ikke. Undertiden kan fremmedstofferne direkte udnyttes som biprodukter ved olieraffineringen.

Mellem uønskede stoffer skal især nævnes *svovlforbindelser*, der kan virke korrosive (frit svovl, sulfider og mercaptaner). Ved forbrænding af olie med indhold af svovlforbindelser dannes svovldioxid og svovltrioxid, som ved forbindelse med vand giver svovlsyrer. Svovlforbindelserne er i de sidste år kommet i søgelyset som følge af deres bidrag til luftforureningen.

Nitrogenforbindelser kan findes i råolie i mængder indtil 0,2 %. De er ikke velkendte; ved destillation fås ofte *pyridiner*, der anses for uønskede. Det samme gælder kulbrinter med syregrupper (carboxyl) i sidekæder.

Indhold i råolie af visse metaller (nikkel, jern, vanadium) kan være skadeligt ved olieforarbejdningsprocesserne. Andre grundstoffer, der tit findes i råolie, er kalium, natrium, kobber og zink.

Naturgas består oftest af 95 % kulbrinter, resten kan være nitrogen, kuldioxid og svovlbrinte. Væsentligste kulbrinte i naturgas er methan, men der findes ofte mindre og varierende mængder af kulbrinter med fra 2 til 8 kulstofatomer (fra ethan til octan). Råolieforekomster og gasforekomster findes ofte nær hinanden. I råolie er tit opløst gas i forskellig mængde. Gasforekomster uden nærliggende olieklender kendes dog også.

2. Mikroorganismer og kulbrinter

Da kulbrinter er naturligt dannede – om end under specielle forhold og på særlige lokaliteter – er det i og for sig forståeligt, at de vil kunne nedbrydes af mikroorganismer. Kulbrinterne tilhører – set over vældige tidsrum – klodens kulstofkredsløb. Da kulstofkredsløbets nedbrydningsdel søger at reducere komplicerede

kulstofforbindelser til stadig enklere former ved hjælp af mikroorganismer med hertil egnet stofskifte, vil også kulbrinterne være omfattet af denne virksomhed, hvis de ydre omstændigheder tillader det.

Historisk

En af de tidligste erfaringer om mikroorganismers evner til angreb på kulbrinter, blev publiceret af *Miyoshi* (1895). Han viste, at skimmelsvampen *Botrytis cinerea* var i stand til at trænge gennem tynde lag af paraffin. Bakteriers udnyttning af methan blev påvist af *Söhngen* (1906). *Söhngen* undersøgte også (1913) mikroorganismers angreb på petroleum, og han er områdets egentlige pioner. *Störmer* var den første, der påviste mikrobielle angreb på *aromatiske* kulbrinter (1908). Siden da foreligger en meget omfangsrig litteratur, hvoraf en stor del er anført i *Davis: Petroleum Microbiology* (1967) og i forskellige oversigter, bl.a. af *ZoBell* (1946). Nærværende behandling støtter sig hertil og endvidere til et udvalg af de nyeste originalarbejder på området.

Mikroorganismers evne til kultrinteudnyttning
Evnen til at anvende kulbrinter som kulstof- og energikilde er kendt fra de fleste grupper af mikroorganismer. Over 100 arter af mikroorganismer, tilhørende bakterier, gærsvampe og skimmelsvampe, vides at være i stand til at udnytte kulbrinter.

De alifatiske kulbrinter kan udnyttes af et stort antal arter mikroorganismer, men nedbrydningen er mere eller mindre fuldstændig. Kædelængden hos kulbrinten synes at være af afgørende betydning for udnyttningen.

Methan udnyttes kun af få bakterier. Ganske særligt nævnes den specialiserede methanudnytter *Methanomonas methanica*.

Ethan, propan og butan udnyttes af et lidt større spektrum af arter. Arter af *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* og *Nocardia* er isoleret fra ophobningskulturer med disse kulbrinter.

Alifatiske kulbrinter med over 10 kulstofatomer nedbrydes af et større artstal end de

kortkædede. Fremhæves må især arter af *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* og ikke mindst *Pseudomonas* som ansvarlige for nedbrydning under naturlige forhold. Adskillige skimmelsvampe (f.eks. *Cladosporium*) og gærarter (især *Candida*) er kendt for angreb på kulbrinter. Interessen for gærarternes udnyttning af kulbrinter er steget stærkt, efter at det teknisk er blevet gennemførligt at dyrke disse på spildolie og paraffin fra raffinaderier – med produktion af protein for øje. Også visse bakterier synes egnet til dette formål.

Aromatiske kulbrinter kan udnyttes af mange jordbundsbakterier og i mindre omfang af skimmelsvampe. Også her er arter af *Pseudomonas* og *Mycobacterium* særlig vel udstyret. Nedbrydning under aerobe forhold indledes med dannelse af hydroxyl ved et eller to kulstofatomer i ringen og følges af ringens åbning nær disse pladser. De højere planter besidder mange forskellige aromatiske forbindelser og disse kan spaltes på samme vis som aromaterne i råolie. Langt vanskeligere stiller det sig, når talen er om de talrige, teknisk fremstillede substitutionsprodukter af aromatiske forbindelser. Ikke mindst gælder det halogen-, sulfonsyre- og nitro-substitutioner. Disse forbindelser er hyppigt anvendt som pesticider. Flere af dem –

f.eks. DDT – er praktisk talt uangribelige for jordbundsorganismer.

Formentlig har de lettere, flydende kulbrinter en toksisk virkning på mikroorganismer, især på bakterier, idet de kan trænge gennem cellevæggen og virke opløsende på lipider og dermed væksthæmmende. Dette er antagelig årsag til, at nogle kulbrinter af lavere orden (*hexan*, *benzen*, *cyclohexan*) ikke omsættes så let som kulbrinter med højere molekylvægt.

Kulbrinter kan oxideres fuldstændigt, således at der ikke ophobes mellemprodukter. I andre tilfælde ophobes intermediære stoffer i bakteriecellerne, eller de udskilles. Det kan bl.a. dreje sig om fede syrer eller estere af sådanne. Under anaerobe forhold kan der ske en nedbrydning med nitrat eller sulfat som brintacceptorer. En fuld klarlæggelse af disse nedbrydninger er endnu ikke til stede; således er det ikke endnu helt sikkert påvist, at de sulfat-reducerende bakterier har sådanne evner. Under anaerobe forhold kan nogle aromatiske forbindelser nedbrydes af foto-autotrofe bakterier (*Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*). Vort nuværende kendskab til anaerob nedbrydning af kulbrinter er i det hele meget mangelfuldt.

De ovenfor refererede almindelige erfaringer vedrørende mikroorganismers forhold til kulbrinter er baseret på publikationer af forsøg, hvis sædvanlige arbejdsgang har været *ophobning* (kontakt mellem kulbrinter og et mikrobielt miljø som jord eller vand) og påfølgende isolering af aktive mikroorganismer. Denne isolering har som kulstofkilde alene haft kulbrinter eller en blanding af kulbrinter. *Perry* og *Scheld* (1967) isolerede talrige bakterier fra jordbunden på et spektrum af substrater, der indeholdt andre kulstofkilder end kulbrinter. Derpå afprøvede de isolaterne for evne til udnyttning af kulbrinter. Ved denne afprøvning viste de isolater, der primært var isoleret på substrater, hvis kulstofkilde har krævet en *oxygenase* (iltningensenzym, der formidler indføring af molekylær ilt i substratet) for udnyttning, den største procent af evne til angreb på kulbrinter. Der synes derfor at være et nært sammenhæng mellem organismernes enzym-



Fig. 1. Eksempel på kulbrinteudnyttede mikroorganisme fra jord. Celler af *Nocardia* sp., isoleret fra jord, tilsat weedkiller oil og inkuberet i 2 måneder. Isolatet viste derefter evne til fortsat vækst i mineralsubstrat, tilsat weedkiller oil som eneste carbonkilde. T. Vincents Nissen fot.

udstyr på det tidspunkt, de udsættes for kontakt med kulbrinten – og deres evne til udnyttning af denne. Hvis organismerne har været forberedt – enzymatisk set – fås en højere udnytningsprocent. Da oxygenaserne kan induceres både af et substrat for og af et produkt af enzymvirkningen kan mange forskellige organiske stoffers tilstedeværelse indirekte få betydning for udnyttning af en kulbrinte. Disse resultater kan følgelig i fremtiden måske ændre det billede af udnyttningen, som ovenfor er givet.

Økologiske faktorer ved kulbrinteudnyttningen

For en mikroorganismes optimale udnyttning af en eller flere kulbrinter kræves et egnet ydre miljø, dels for væksten, dels for selve den særlige udnytningsproces. Passende ilttilførsel, temperatur og fugtighed, tilstedeværelse af egnet nitrogenkilde og af de fornødne mineraler samt en egnet reaktion er væsentlige faktorer. Endvidere har dispersionsgraden af kulbrinten samt eventuel tilstedeværelse af andet organisk materiale betydning.

1. *Ilt* Mikrobiel omsætning af kulbrinter er overvejende en aerob proces (kræver tilstedeværelse af ilt). Anaerob omsætning af kulbrinter vil formentlig hyppigst forekomme med nitrat eller sulfat som brintacceptorer.

2. *Temperatur* Langt de fleste forsøg vedrørende kulbrintenedbrydning er foretaget under normale laboratoriebetingelser, d.v.s. i temperaturintervallet 22-37° C. Det vides, at udnyttning kan finde sted ved temperaturer lidt over nulpunktet, og også eksempler på termofil nedbrydning (55-60° C) er kendt.

3. *Fugtighed* Temperatur og fugtighed kan til en vis grad have indbyrdes afhængighed for nedbrydningens forløb. Således anses en lavere temperatur at kunne kompenseres af en højere fugtighed. Visse grupper af mikroorganismer, især aktinomyceterne, er i stand til at vokse ved lavere fugtighedsindhold end andre.

4. *Nitrogenkilde og mineralkrav* Som nitrogenkilde for kulbrinteudnyttning benytter nogle uorganisk nitrogen (nitrat, ammoniumforbindelser) andre organisk nitrogen, atter andre kan bruge både uorganisk og organisk nitrogen. Nogle kulbrinteudnyttende bakterier vides at være i stand til at binde atmosfærisk nitrogen.

For optimal kulbrinteudnyttning under laboratorieforhold synes en vel afbalanceret mineralsaltopløsning at have stor betydning. Phosphat er særlig nyttigt, formentlig både for enzymsystemerne og for stødpudevirkning ved syredannelse under stofskiftet.

5. *Reaktion* Den optimale reaktion for kulbrinteudnyttning modsvarer optimum for vækst af bakterier, d.v.s. den ligger for de flestes vedkommende omkring neutralpunktet.

6. *Dispersionsgrad* Bortset fra de luftformige kulbrinter er opløseligheden af kulbrinter i vand lav. Der er dog tale om en vis opløselighed (jvnfr. hosstående tabel). Meget betydningsfuld er størrelsen af den overflade, hvorover mikroorganismerne får kontakt med kulbrinterne. Da bakterier ofte er direkte knyttet til væskehinden omkring jordpartikler og til væskemellemrum, vil jordpartiklernes samlede overflade være en væsentlig faktor for omsættningens forløb. Emulsionsdannelse mellem vand og olie vil også fremme kontakten mellem mikroorganismer og kulbrinter.

Opløselighed af kulbrinter i vand

(efter H. Eilers, Wasser, Boden, Luft, 50, s. 58 (1960))

n-heptan	45 mg/liter
n-hexan	86 mg/liter
n-pentan	350 mg/liter
toluol	470 mg/liter
benzol	800 mg/liter
petroleum	10 mg/liter
dieselolie	22,5 mg/liter
autobenzin	149 mg/liter

7. *Andre organiske stoffer* Tilstedeværelsen af en ringe mængde organisk stof synes at fremme

kulbrintenedbrydning. Større mængder organisk stof virker direkte hæmmende, idet de da foretrakkes af mikroorganismer frem for kulbrinten.

Nedbrydning af kulbrinter under naturlige forhold
Selv om udsivning af gas og råolie ikke er et almindeligt fænomen, forekommer det dog spredt mange steder på klodens overflade. Da atmosfærens indhold af kulbrinter er yderst lavt, og da egentlige oliestøer ikke findes, må der over lange tidsrum kunne ske en nedbrydning af kulbrinterne. Mikroorganismer har antagelig ansvaret for kulbrinternes forsvinden på steder, hvor man skulle forvente en akkumulering. Denne antagelse er i overensstemmelse med den rigeligere forekomst af kulbrinteu-dnyttende mikroorganismer i og ved gas- og olie-felter. Forekomsten er her så udpræget, at der er udarbejdet metoder til *olieeftersøgning* ved en mikrobiologisk analyse af jorden. Det må dog tilføjes, at en nødvendig forudsætning, for at olienedbrydende organismer under naturlige forhold kommer i funktion, er tilstedeværelsen af de ovenfor omtalte ydre betingelser, ikke mindst af egnet nitrogenkilde og fosfat.

Uden for gas- og olie-områder findes kulbrinteu-dnyttende mikroorganismer spredt i naturen; i jord, kompost, gødning, kloakslam, flodmudder og havbundsmateriale. Udbredelsen har stor interesse, ikke mindst efter de seneste undersøgelser, der tager problemet om de rette isoleringssubstrater op til ny vurdering.

Olieforurening og mikroorganismer

Studiet af mikroorganismers virksomhed efter *olieforurening* er endnu kun i sin vorden. De nærmere enkeltheder ved den mikrobielle nedbrydning efter lokal olieforurening er endnu ukendte. De her givne referater af nogle få nyere undersøgelser må derfor tages med det forbehold, at billedet kan blive ændret, når systematiske undersøgelser kommer i gang. Endvidere kan forholdene skifte fra sted til sted, alt efter klimaet og karakteren af det forurenede miljø.

Olieforurening af vand

Ved udledning til eller spild af olie i fersk- og saltvand vil nedbrydningen af kulbrinter være betinget af et samspil mellem de biologiske og de fysiske og kemiske forhold.

Efter kontakt med vandfasen vil olie hurtigt spredes i et tyndt lag, en oliehinde, på vandoverfladen. De letteste fraktioner i olien vil have mulighed for at fordampe. En vis del af oliens komponenter vil kunne opløses i vand. Men i øvrigt vil oliehindens stabilitet være påvirket af vind og strøm. Hvor olien har mulighed for adsorption til partikler, vil der kunne ske en nedsynkning til søens eller havets bund.

Ved kraftig omrøring kan der foregå en vis emulsionsdannelse. Jo mindre kugler, der findes i emulsionen, jo større overflade vil der være for den biologiske nedbrydning. Aerobe, kulbrinteu-dnyttende bakterier i den frie overflademasse vil have mulighed for at begynde arbejdet. Men deres virksomhed vil være stærkt begrænset af temperaturen og af kontrollerende kemiske faktorer som nitrat og fosfat. De vil ganske overvejende nøjes med kun at angribe ligekædede kulbrinter af mellemste molekylvægt, hvorfor grenede og cykliske, høj-molekylære kulbrinter vil kunne persistere i lange tider uden biologisk angreb.

Studiet af nedbrydning af olieforurening i russiske floder viser, at det primære aerobe angreb på olien i vandoverfladen efterhånden meddeler restolien så megen tyngde og adsorptionsmulighed, at den synker til bunds. I flodmudderet vil der da foregå et nyt angreb på olien. Her er nitrat og sulfat formentlig brint-acceptorer for de nedbrydende bakterier. Ved bedømmelsen af denne virksomhed må hensyn tages til den (levende eller døde) biomasse af bakterier og partikler, der sammen med olien og delvis hæftet til denne er ankommet til bunden. I bundlaget sker nu en række processer, som bevirker, at der udvikles luftbobler (bl.a. methan). Dette har til følge, at olien, båret af luftbobler, i det tredje trin af nedbrydningen på ny føres op til overfladen, hvor der måske igen kan ske nogen nedbrydning. Denne bevægelse af olien kan gentages adskillige gange.

Efter måneders forløb kan olien på denne måde forsvinde. Der er dog ingen tvivl om, at temperaturen spiller en stor rolle for hastigheden. Det er således kendt, at under arktiske himmelstrøg varer det meget længe, før olien forsvinder – og dette forhold må der tages hensyn til, når olieletter i disse områder skal udnyttes.

Det er ikke blot søfugle i store antal, der omkommer som følge af oliespild på havet. Nye undersøgelser efter olieforurening viser, at populationen af søpindsvin, snegle og muslinger skades i udstrakt grad. I et enkelt tilfælde er det påvist, at skaden på havets fauna – og dermed på hele fødekæden – efter en olieudledning fra en tankdamper i en bugt i 1957 – endnu ikke i 1967 var overvundet. Også påvisning af *benzpyren* – et som cancerfremkaldende kendt kulbrintederivat – i bundlag og i plankton i Middelhavet, formentlig hidrørende fra olieforurening, giver grund til større opmærksomhed for de sekundære virkninger af en olieskade.

Olieskaderne på havet kan bekæmpes ved tilførsel af oliebindende partikler, detergenter eller olieopløsende stoffer. Virkningsfulde metoder synes at være under udvikling, men olie fjernelsen må ikke være for kostbar en proces. De anvendte midler skal også være neutrale, så de ikke giver uønskede eller ukendte bivirkninger.

I forurenede vand (spildevand, afløb fra renseanlæg) er olie kun meget tungt omsætteligt, antagelig på grund af, at der her eksisterer et spektrum af langt lettere nedbrydbare forbindelser, som mikroorganismene kan udnytte.

Hvis olie (f.eks. dieselolie eller fyringsolie) via jorden når grundvandet, vil den kun meget langsomt kunne nedbrydes og fjernes. Grundvandets anvendelse som drikkevand vil i så fald hurtigt være i fare, idet så lidt som en liter olie skal kunne ødelægge en million liter drikkevand. I erkendelse heraf må alle gamle olietanke sikres, og alle nye tanke må konstrueres med henblik på hindring af lækage. Ved planlægning af industri og landbrug i fremtiden må vandforsyning, borer og brønde, fjernes længst muligt fra olieoplagring – eller omvendt.

Olieforurening af jord

1. Virkning på jordbundens fysiske forhold

Ved tilførsel af flydende kulbrinter i større mængder, sker der væsentlige ændringer i jordbundens *fysiske* beskaffenhed. Krummestrukturen går tabt, og jordbunden kan i tør tilstand få en tæt, fast, voksagtig karakter. Den vil modsætte sig vædning fra overfladen, men er den olieskadede jord først blevet vædet, har den tendens til at forblive våd. Lignende ændringer ses ved gasudsivninger i jord.

Stor interesse samler sig om oliens nedsivning i jordbunden. Nedsivningshastighed og nedsivningsdybde vil afhænge af den pågældende kulbrinteblandings natur, især af dens vægtfylde. Endvidere vil jordbundens beskaffenhed være ganske afgørende. Der er yderligere stor forskel på et lokalt oliespild på f.eks. 1000 liter og samme mængde fordelt over en hektar jord.

Hvis det antages, at 30 % af jordens totalrumfang er hulrum, vil et spild af 20 liter olie på 1 kubikmeter jord give 6,6 % udfyldning af jordhulrummene. Denne beregning er dog kun teoretisk, idet en vis del af den tilførte olie vil være adsorberet til jordpartikler. Der er næppe tvivl om, at så store mængder olie vil kunne nå en betydelig udbredelse i dybden, idet oliens vandring først standser, når den totale mængde alene bindes ved jordens adsorptionskræfter. En forurening af både drænvand og grundvand vil være mulig ved kraftig lokal forurening, idet jordbundens beskaffenhed og afløbsforholdene vil være afgørende for omfanget af skaden.

Andersen (1969) har i en indgående rapport beskæftiget sig med muligheden for olieforurening af dansk jordbund ved udsivning fra gennemtærede, nedgravne olietanke. I tilfælde af oliespild vil der først foregå en lodret nedsivning gennem jordlagene – og derpå en vandret udbredelse af olien over grundvandet. Den vandrette udbredelse vil være afhængig af jordens karakter; eksempelvis nævnes det, at man ved et oliespild på 10.000 liter vil få en vandret fladeudbredelse over ca. 1250 m² i porøs jord. Men der ligger yderligere den fare for-

bundet med oliens nedsivning, at en del af olien opløses i grundvandet og bevæger sig sammen med dette, d.v.s. herved kan et større område forurennes. Der vil herved kunne opstå fare for vandindvindingen.

Det anføres, at der i Bayern fra 1954-1964 er sket 338 tilfælde af olieforurening, hvoraf 17 har medført gener for vandindvindingen. Det frygtes, at yderligere 41 vil manifestere sig som vandforureningskilder i de kommende år. Det påpeges, at der officielt kendes 11 tilfælde af olieforurening i Danmark, men at det reelle tal måske ligger meget højere. Bl.a. på grund af heldigt standende jordlag er der ikke sket skade på grundvandet, eller også er en sådan skade ikke opdaget, fordi der ikke foregår en indvinding af grundvand på de pågældende steder. Der kan derfor udmærket være tale om en latent olieforurening af grundvandet flere steder i Danmark allerede nu.

Forureningsfaren for grundvandet i Danmark er naturligt størst, hvor der er ringe dybde til grundvandsspejlet. I langt den største del af Danmark er dybden til grundvandsspejlet kun mellem 5 og 15 meter. (Andersen 1969).

Ved en fladeudbringning – for eksempel som bærestof for herbicider – vil det måske dreje sig om mængder omkring 0,1 liter pr. kvadratmeter. Dette giver pr. kubikmeter 0,33 % udfyldning af hulrummene. I lerholdig skovjord fandt Böning et alii. (1965) kun ved anvendelse af endnu større doser en nedtrængning af olien til 50 cm dybde. I skovjord synes dog adsorption til humuspartikler at være specielt fremtrædende og måske hindrende for kapillær fremtrængning af olien. Endnu to år efter tilførslen fandtes oliekuilstof (C^{14}) i huminsyrefraktionen i humus i skovjord.

Forureningsfaren ved brug af olieemulsioner for sprøjtemidler eller ved anvendelse af de såkaldte *weedkiller oils* bør ikke undervurderes, og tilladelsen til brugen af sådanne midler bør tages op til fornyet overvejelse. Der bør her tages i betragtning, at olieforurening af grundvandet kan manifestere sig særdeles langsomt – og når den først er opstået, vil den være vanskelig at fjerne inden for en rimelig tid. Der

vil altså på et senere tidspunkt kunne opstå alvorlige skader ved oliespild og formentlig også ved for høj dosering af olie til sprøjtning, idet denne kun i ringe grad omsættes.

En større lokal olieforurening, hvorved 1500 tons råolie løb ud i agerjord, er refereret af Grummer (1964). I alt 10 hektar jord blev skadet. Skadens fysiske virkninger beskrives som en væsentlig ugunstig ændring af fordelingen af porestørrelsen i jordbunden (meget forhøjet andel af porer under $0,2 \mu$) i et i øvrigt omtrent uændret samlet porevolumen. Jordens permeabilitet for vand var stærkt forringet.

Utvivlsomt vil forureningsbilledet afhænge meget af jordbundens karakter og afløbsforholdene, og formentlig vil klimatiske faktorer også kunne gøre sig gældende. En undersøgelse af olieskader på dansk jord må omfatte vidt forskellige jordbundstyper under hensyntagen til årstid og klima.

2. *Virkning på jordbundens kemiske forhold*
Olieforureningsindflydelse på de jordbunds-kemiske forhold vil have nær tilknytning til de fysiske ændringer og til de mikrobiologiske forandringer.

En fremtrædende virkning skyldes ændringer i jordens reduktions- og oxidationsforhold. Ved tilførsel af olie eller gas bliver jordens reducerende egenskaber forstærket. En følge heraf er højere opløselighed for mangan- og jernforbindelser. En undersøgelse af gasmættet jord viste således store stigninger i indholdet af ombytteligt mangan og jern. Også det tilgængelige phosphor øges, formentlig af samme årsag, idet jernphosphater under reducerende omstændigheder kan blive lettere opløselige.

Ved olieforurening skal nitratindhold i grundvand kunne falde eller forsvinde, formentlig som følge af nitratreduktion under de ringere udluftningsforhold i jorden.

3. *Virkning på jordbundens mikroorganismer*
De fysiske og kemiske ændringer i jordbunden ved olietilførsel vil øve indflydelse på mikroorganismernes aktivitet i jordbunden. Den ringere udluftning af jorden og den nedsatte permeabilitet for vand er faktorer, der har væ-

sentlig mulighed for at påvirke den mikrobielle virksomhed. Omvendt kan mikroorganismerne måske delvis være ansvarlige for tabet af krummestruktur og for forøgelsen af den reducerende evne. Nogle få mikrobiologiske undersøgelser efter olieskader synes at vise et fald i de samlede tal for både bakterier og svampe umiddelbart efter forureningens indtræden. Det antages, at der derpå sker en forøgelse af tallet for de mikroorganismer, der kan udnytte olie, og tilsvarende et fald i de ikke-kulbrentenedbrydende formers antal. *Steubing* (1967) viste for skovjords vedkommende en stigning af antallet af *mycobakterier* efter olieforurening og et fald i tallene for *Azotobacter* og cellulosenedbrydere i sammenligning med nærliggende uforurenede jord. Også nitrogenbindingen i den olieforurenede jord var nedsat.

Der er grund til at antage, at forløbet af virkningen på den mikrobielle aktivitet ved olieforurening vil være vidt forskelligt i forskellige jordbundstyper, afhængig af bl.a. humusindhold, tilgængeligt nitrogen og phosphor, pH og karakteren af stedets naturlige mikroflora. Også de klimatiske faktorer vil have betydelig indflydelse.

Efter olietilførsel ses en stigning i jordens kuldioxidproduktion. Efter *Süss et alii* (1968) er stigningen næppe alene udtryk for nedbrydning af kulbrinter i den tilførte olie, men også en virkning af stimulerende karakter på omsætningen af jordbundens egne organiske stoffer. Da disse undersøgelser blev udført med C^{14} mærket *n*-hexadecan, er der grund til at tillægge dem en vis vægt.

Lignende forandringer i jordbundens mikroflora indtræffer i nærheden af nedlagte ledninger med asfaltisolering og under asfalt på landeveje, hvor betingelserne måtte være til stede (direkte kontakt med jord). Der ses her ofte en lokal opformering af asfaltenedbrydende mikroorganismer – med huldannelser i asfalten som følgevirkning.

4. Virkninger på plantevæksten

Det er et velkendt fænomen, at planter er føl-

somme, omend i varierende grad, overfor gas, stammende fra utætte ledninger. Dette gælder såvel i det frie (vejtræer, parker) som for stueplanter. Når jord tilføres gas fra en utæthed, vil dels røddernes iltforsyning mindskes, dels kan der udvikles et reducerende miljø. En heraf følgende ophobning af mangan- og ferro-ioner forklarer formentlig en del af den opståede skadevirkning på plantevæksten.

Ved olieforurening ses en skadevirkning, der alt efter omfanget kan variere fra total eliminering af plantevæksten for en længere periode til en påvirkning af udbyttet i ugunstig retning. Tilførsel af ganske ringe mængder olie til jord skal i visse tilfælde have haft positiv indflydelse på høstudbyttet, bl.a. af soyabønner. Hvis disse iagttagelser er rigtige, skyldes forbedringen i så fald formentlig en stimulering af den mikrobielle aktivitet.

Et nærmere studium af virkningen af en lokal olieforurening på plantevæksten er udført af *Grummer* (1964). Et område med agerjord, der havde været udsat for en kraftig skade ved udløb af råolie, blev undersøgt i 3 år derefter. Ved såning af korn på arealet viste der sig hurtigt en vækststandsning i det fremspirende korn, idet planterne trods tilført gødning viste symptomer på N- og K-mangel formentlig på grund af forstyrrelser i vandbalancen. Den rodbevoksede jords struktur var nedbrudt og var klistret og fortættet. Nogle steder havde jorden en rådden lugt, der tydede på anaerobe forhold. Først efter 3 år var plantevæksten fuldt etableret igen på skadestedet.

5. Jordbehandling efter olieskader

Nogle af publikationerne vedrørende olieskader fremhæver mekanisk dybdebehandling af den skadede jord som bedste fremgangsmåde til skadens afhjælpning. Ved dybløsning af jorden fremmes den aerobe omsætning, og jordens reducerede tilstand ændres. Tilførsel af organisk gødning, især staldgødning, kan medvirke til fjernelse af skadevirkning. I tilfælde af meget kraftige forureninger er bortskaffelse af den skadede jord dog den bedste løsning.

Indledende eksperimentelle undersøgelser over nedbrydning af kulbrinter

1. Måling af kuldioxidproduktionen i jord efter tilførsel af de såkaldte weedkiller oils

Ved forsøgene anvendtes to til ukrudtsbekæmpelse godkendte midler (weedkiller oils, henholdsvis markedsført af oliefirmaerne *Esso* og *Shell*).

Kuldioxidproduktionen i jord målt efter *Petersens* metode (1926). I alle forsøg anvendtes 4 parallelkolber. De anvendte tilsætninger var følgende:

- A. ingen tilsætning
- B. 0,1 % weedkiller oil + 0,01 % amm
- C. 0,25 % » » + 0,025 %
- D. 0,5 % » » + 0,05 %
- E. 1,0 % » » + 0,1 %

Forsøgene varede 1 måned ved 25° C.

Amm. = ammoniumnitrat.

Fig. 2-3 viser samlede mængder udviklet kuldioxid, udtrykt i mg CO₂ pr. 50 gram jord som funktion af tiden. Den største mængde af udviklet kuldioxid i forsøgsperioden ses for *Shell* weedkiller oil (fig. 3.).

2. Beregning af mulig omsat weedkiller oil i forsøgstiden

Kulstofmængden i de anvendte weedkiller oils udgør:

<i>Shell</i> weedkiller oil	<i>Esso</i> weedkiller oil
C: 86,32 %	C: 84,72 %

På grundlag af denne analyses resultater er den udviklede kuldioxidmængde omregnet til oliekulstof. Denne beregning forudsætter, at al den udviklede kuldioxid hidrører fra olie i jorden. (Korrigeret for blindværdi).

Teoretisk mulig omsat olieculstof

(i procent af tilført):

<i>Esso</i> weedkiller oil		<i>Shell</i> weedkiller oil	
B	1,29 % C	B	7,65 % C
C	9,44 % C	C	13,02 % C
D	10,90 % C	D	11,1 % C
E	12,56 % C	E	15,77 % C

Beregningerne viser, at i forsøgsperioden (1 måned) er højst 12-15 % af den tilsatte olie-mængdes kulstof omsat til kuldioxid. Da der,

som ovenfor nævnt, er sandsynlighed for en stimulerende virkning på jordbundens omsætning (og dermed på kuldioxidproduktionen) ved tilsætning af kulbrinter, er det antageligt, at den reelle omsætning af olien er mindre, end de her fundne værdier antyder.

CO₂-udvikling i jord med *ESSO* Weedkiller Oil

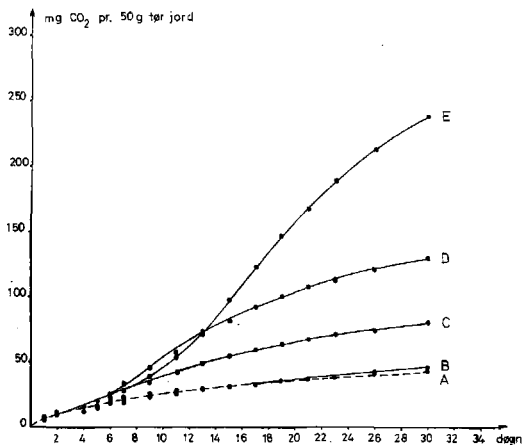


Fig. 2. Udvikling af kuldioxid i jord tilsat *Esso* weedkiller oil. A kontrol, B - E stigende tilsætning af olie. (Se i øvrigt teksten).

CO₂-udvikling i jord med *SHELL* Weedkiller Oil

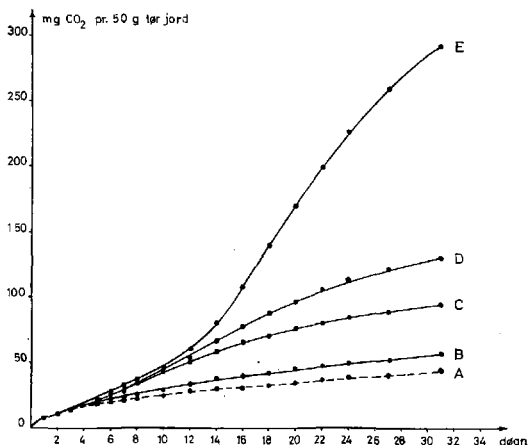


Fig. 3. Udvikling af kuldioxid i jord tilsat *Shell* weedkiller oil. A kontrol, B - E stigende tilsætning af olien. (Se i øvrigt teksten).

3. Nedbrydningsforsøg i inkuberet jord

Der hensættes prøver, bestående af 200 g tør havejord med tilsætning af 18 % vand og 2 % weedkiller oil, i Erlenmeyer-kolber (med 4 kolber i hvert forsøgsled). Inkuberingstid: 2 måneder. Temperatur: 25° C. Forsøget var således inddelt:

1. Usteril jord uden tilsætning
2. Steril jord + 2 % Shell weedkiller oil
3. Usteril jord + 2 % Shell weedkiller oil

Der blev efter forsøgsperiodens afslutning foretaget nogle orienterende *gaschromatografiske* undersøgelser.

Jordprøverne blev forinden ekstraheret med n-hexan, og opløsningerne destilleret til fjernelse af hovedmængden af hexan. Følgende prøver blev derefter underkastet *gaschromatografisk* analyse:

- I. Ren Shell weedkiller oil.
- II. Samme, men opløst i n-hexan (i koncentration modsvarende ekstrakt af jordprøve, indeholdende 2 % olie).
- III. Ekstrakt af jordprøve, tilsat 2 % Shell lige før ekstraktion (ikke inkuberet).
- IV. Ekstrakt af usteril jord uden tilsætning (*inkuberet*, ovennævnte 1).
- V. Ekstrakt af steril jord + 2 % Shell (*inkuberet*, ovennævnte 2).
- VI. Ekstrakt af usteril jord + 2 % Shell (*inkuberet*, ovennævnte 3).

Sideløbende med *gaschromatografering* blev foretaget nogle orienterende analyser på *massespektrometer*.

Resultater:

Gaschromatografering af prøve IV (ekstrakt af inkuberet jord uden tilsætning) viste, at der ikke herfra er ekstraheret stoffer, der vil kunne få indflydelse på øvrige chromatogrammer.

På grundlag af de *gaschromatografiske* analyser kan det foreløbig siges, at der er mindst 35-40 komponenter i olien. Massespektrene angiver, at de største toppe ligger fra 128-168 svarende til C₉-C₁₂, hvilket er i overensstemmelse med leverandørens opgivelse af koge-

punktsinterval for olien (145-200° C).

Ved sammenligning mellem (fig. 4-6) chromatogrammet for III, (chromatogram for jord med olie uden inkubering) og chromatogram V (steril, inkuberet jord med olie) og chromatogram VI (usteril, inkuberet jord med olie) kan det ses, at der er en betydelig forskel mellem på den ene side III og på den anden side V og VI. Der er forskel såvel i antal af komponenter som i forholdet mellem toppenes størrelse. Da forskellen findes både mellem III og V (steril forsøg) som mellem III og VI (usteril forsøg) må forskellen tilskrives fordampning eller andre ikke-biologiske faktorer i forsøgstiden.

Ved sammenligning mellem chromatogrammerne V (forsøg i steril jord) og VI (forsøg i usteril jord) er forskellene mindre øjnefaldende. Der er dog forskelle ved nogle mindre toppe, svarende til ændringer af enkelte komponenter.

Mikrobiologiske undersøgelser i tilknytning til kuldioxidforsøgene.

Under og efter målingerne af kuldioxidproduktionen i jord, tilsat weedkiller oils, blev der foretaget orienterende spredninger på mineralagar, tilsat steril weedkiller oil med pipette, og på mineralagar i petriskåle, i hvis låg var anbragt filterpapir, som blev vædet med weedkiller oil.

Isolaterne fra disse spredninger blev overført til rørglas med mineralsaltopløsning tilsat 1 ml weedkiller oil med pipette. Såvel ved spredningerne som ved de videre vækstofforsøg var den eneste kulstofkilde en af de to undersøgte weedkiller oils.

Af 38 forskellige isolater fra den primære spredning af jord fra kuldioxidforsøget med jord + Esso weedkiller fandtes 27 fremdeles at kunne vokse i de sekundære vækstofforsøg i flydende substrat. Af 34 forskellige isolater fra jordforsøg med Shell weedkiller havde kun 12 evne til videre vækst i det sekundære substrat.

De isolerede mikroorganismer, der viste god vækst i flydende mineralsubstrat med tilsat weedkiller oil, tilhørte slægterne *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia* og *Pseudomonas*.

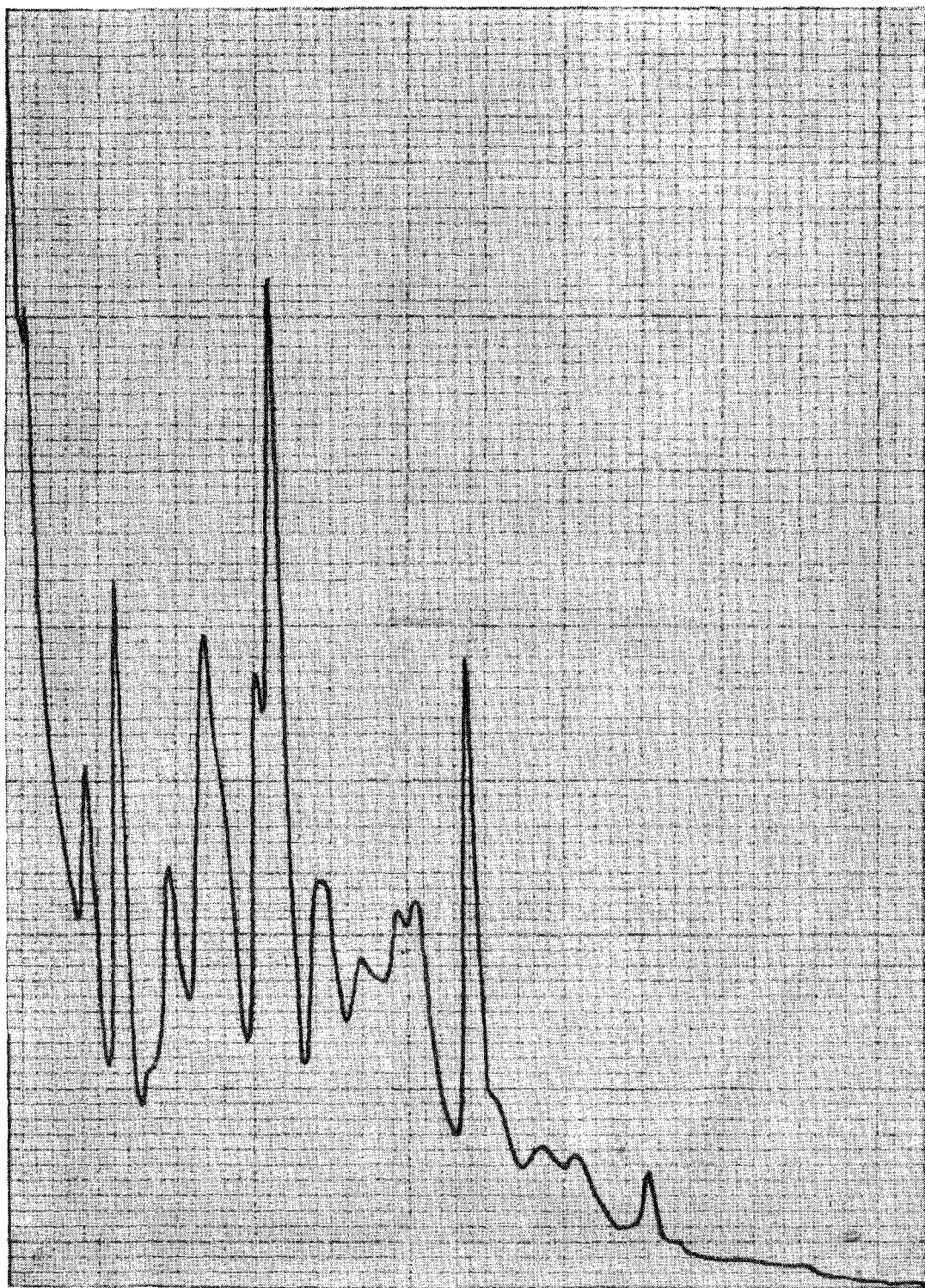


Fig. 4. Gaschromatogram for jord med tilsat weedkiller oil (usteril, ikke inkuberet).

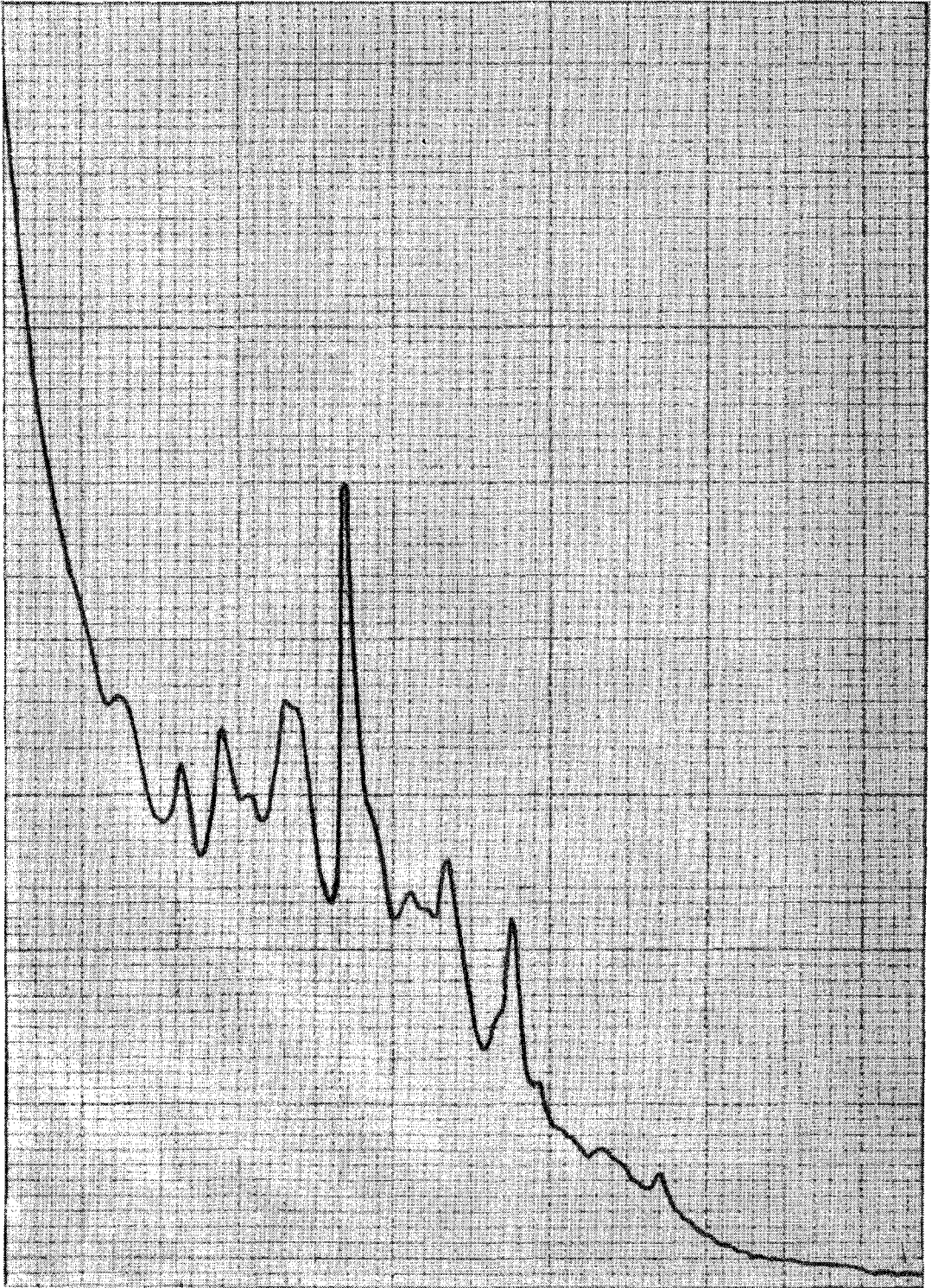


Fig. 5. Gaschromatogram for jord (steril, inkuberet med olie).

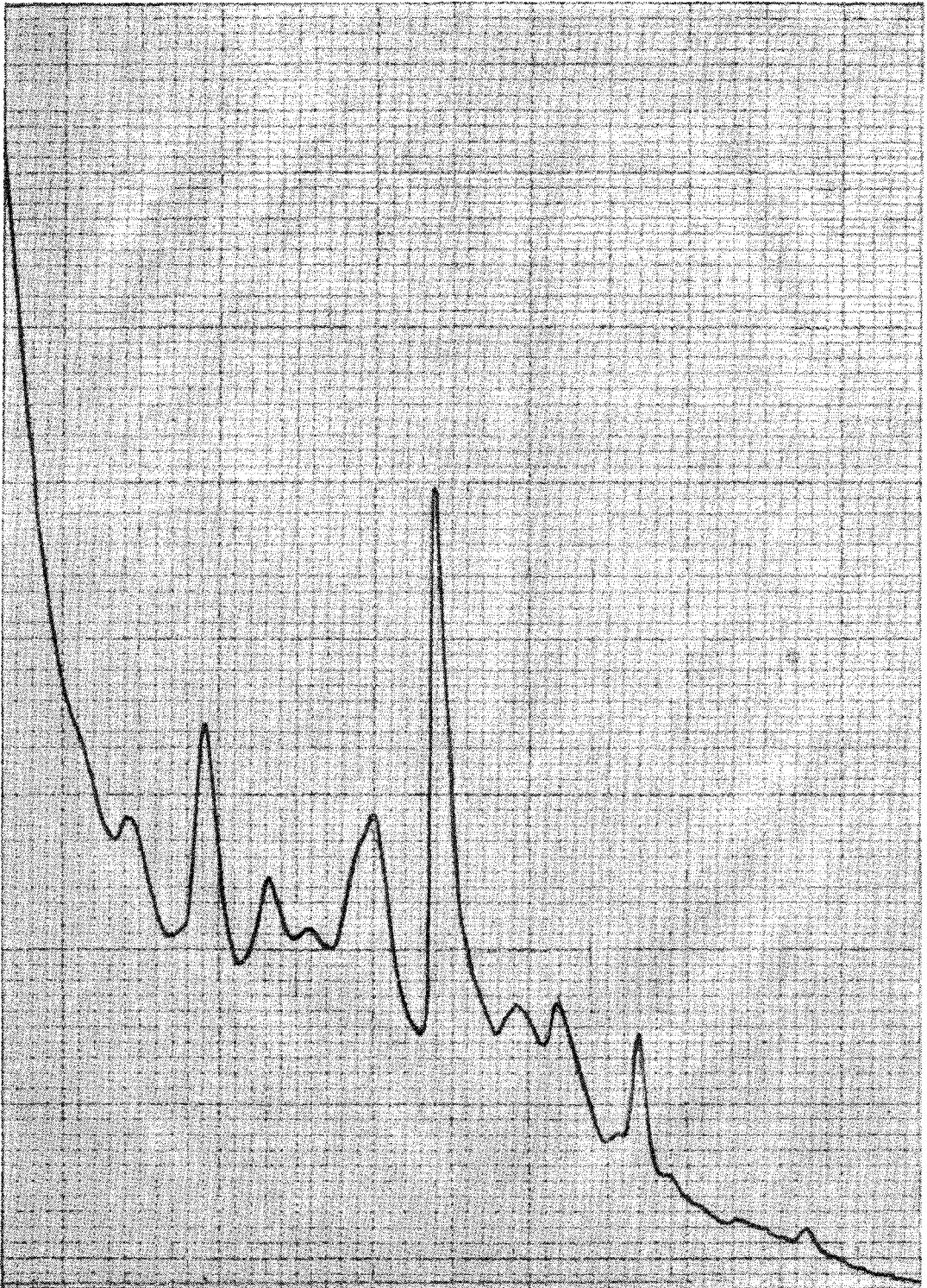


Fig. 6. Gaschromatogram for jord (usteril, inkuberet med olie).

Åge Jart

Nogle bakterieisolater kunne ikke umiddelbart identificeres.

De mikrobiologiske resultater er i god overensstemmelse med den antagelse, som begrundes i kuldioxidforsøgene og de gaschromatografiske undersøgelser, at der i forsøgstiden (1 måned) foregår en vis, men dog ikke særlig betydelig, nedbrydning af de to weedkiller oils. For den praktiske anvendelse af weedkiller oils er det efter forsøgsresultaterne rimeligt at tilråde den størst mulige forsigtighed med anvendelse af disse, hvor der er mulighed for afledning til drænvand, grøfter eller andre vandløb, eller hvor der er chance for nedsivning til grundvand.

De kemiske undersøgelser er foretaget af akademiingeniør, *Anne-Margrethe Lind*, i samarbejde med lektor *Åge Jart*, Danmarks tekniske Højskole og *Preben Hansen*, Organisk Laboratorium, H. C. Ørsted Institutet, Københavns Universitet. Ved kuldioxid-forsøgene og de mikrobiologiske undersøgelser har laborant *Anna-Lise Hansen* medvirket. Alle, der har ydet bistand ved de orienterende undersøgelser, bringes herved en hjertelig tak.

Summary

Biological degradation of hydrocarbons with special reference to soil contamination.

A review is given of the recent literature on the decomposition of hydrocarbons by microorganisms.

Introductory experiments on degradation of weedkiller oils in soil have been carried out (determination of carbon dioxide production after addition of weedkiller oil and gaschromatographical and microbiological analyses of the soil).

The results indicate, that not over 15 per cent of the weedkiller – added to the soil – has been utilized by the soil microorganisms in four weeks.

The use of weedkiller oils may therefore in the long run involve a contamination risk.

Litteratur

1. *Andersen, L. J.*: Rapport over de geologiske, hydrologiske og vandindvindingsmæssige forhold i Danmark i relation til olieforurening af grundvandet. Bet. fra indenrigsministeriets udvalg af 24.11.1965, 77-131 (1969).
2. *Bushnell, L. D.* and *H. F. Haas*: The utilisation of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bact.* 41, 653-672 (1941).
3. *Böning, K., F. Hinke, A. Süß* und *A. Netzsch-Lehner*: Über das Verhalten von Dieselöl im Boden bei Verwendung als Träger für Wachstoffsstoffe zur Bekämpfung der Berberitze und anderer Gehölzarten sowie zur Läuterung von Jungforstanlagen. *Bayr. Landwirtsch. Jahrb.* 42, 844-867 (1965).
4. *Claus, D.* and *N. Walker*: The decomposition of toluene by soil bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 36, 107-122 (1964).
5. *Davis, J. B.*: *Petroleum Microbiology.* 604 s. New York 1967.
6. *Dobson, A. L.* and *H. A. Wilson*: Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons. *Proc. Soil Science* 28, 536-539 (1964).
7. *Ellis, R.* and *R. S. Adams*: Contamination of soils by petroleum hydrocarbons. *Adv. in Agron.* 13, 197-216 (1961).
8. *Foster, J. W.*: Hydrocarbons as substrates for microorganisms. *A. v. Leeuwenhoek* 28, 241-274 (1962).
9. *Fredericks, K. M.*: Adaptation of bacteria from one type hydrocarbon to another. *Nature*, 209, 1047-1048 (1966).
10. *Gray, P. H. H.* and *H. G. Thornton*: Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds. *Centrbl. Bakt.* II, 73, 74-96 (1928).
11. *Grummer, H. J.*: Untersuchungen an einem mit Rohöl überfluteten Sandboden im Emsland. *Landw. Forschung*, 17, 229-243 (1964).
12. *Jones, J. G.* and *M. Ann Edington*: An ecological survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 52, 381-390 (1968).
13. *Jones, J. G.*: The determination of microbial hydrocarbon metabolism in natural environments. *Arch. Mikrobiol.* 67, 397-407 (1969).
14. *Mc. Kenna, E. J.* and *R. E. Kallio*: The biology of hydrocarbons. *Ann. Rev. Microbiol.*, 19, 183-208 (1965).
15. *Klug, M. J.* and *A. J. Markovetz*: Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. *Appl. Microbiol.* 15, 690-693 (1967).
16. *Lukins, H. B.* and *J. W. Foster*: Utilisation of hydrocarbons and hydrogen by mycobacteria. *Z. Allgem. Microbiol.* 3, 251-264 (1963).
17. *Miyoshi, M.*: Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrb. wiss. Bot.* 28, 269-289 (1895).

18. Olietanke og beskyttelse af grundvandet. Betænkning fra indenrigsministeriets udvalg af 24.11.1965 1-72 (1969).
19. Perry, J. J. and H. W. Scheld: Oxidation of hydrocarbons by microorganisms isolated from soil. *Canad. J. Microbiol.* 14, 403-407 (1968).
20. Petersen, E. J.: Undersøgelser over forholdet mellem jordens kulsyreproduktion, kemiske tilstandsform og mikrobiologiske aktivitet. *Tidsskr. f. Planteavl* 32, 625-672 (1926).
21. Raymond, R. L., W. W. Jamison and J. O. Hudson: Microbial hydrocarbon co-oxidation. *Appl. Microbiol.* 15, 857-865 (1967).
22. Schlegel, H. G.: *Allgemeine Mikrobiologie.* 431 s. Stuttgart 1969.
23. Shaposhnikov, V. N., E. I. Kozlova and Z. A. Arkad'eva: Microflora of petroleum-containing sewage. *Mikrobiologiya* 37, 511-517 (1968).
24. Steubing, L.: Untersuchungen über die Veränderung der Mikroflora eines Waldbodens durch eingedrungenes Heizöl. *Angew. Bot.* 90, 275-286 (1967).
25. Stone, R. W., M. R. Fenske and A. G. C. White: Bacteria attacking petroleum and oil fractions. *J. Bact.* 44, 169-178 (1942).
26. Störmer, K.: Ueber die Wirkung des Schwefelkohlenstoffs und ähnlicher Stoffe auf den Boden. *Zentrbl. Bakt.* II, 20, 282-286 (1908).
27. Süß, A., A. Netsch-Lehner und W. Nowak: Veränderung von Dieselölkomponenten in zwei Böden. *Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 122, 4-18 (1969).
28. Süß, A. und A. Netsch-Lehner: Beeinflussung der Abbauintensität von Dieselölkomponenten durch verschiedene Mikroorganismen. *Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 123, 232-239 (1969).
29. Söhngen, N. L.: Ueber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Zentrbl. Bakt.* II, 15, 513-517 (1906).
30. Söhngen, N. L.: Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. *Zentralbl. Bakt.* II, 37, 595-609 (1913).
31. Zo Bell, C. E.: Actions of microorganisms on hydrocarbons. *Bact. Rev.* 10, 1-49 (1946).