

# Påverkan på mikroorganismer i grundvatten

## Biostimulering med syreavgivande medel

MARTINA STRÖMBERG 2018  
MVEM12 EXAMENSARBETE FÖR MASTEREXAMEN 30 HP  
MILJÖVETENSKAP | LUNDS UNIVERSITET



© Martina Strömberg  
MVEM12 Examensarbete för masterexamen 30 hp, Lunds universitet  
Intern handledare: Per Bengtson, biologiska institutionen, Lunds  
universitet  
Extern handledare: David Hagerberg, Tyréns

CEC - Centrum för miljö- och klimatforskning  
Lunds universitet  
Lund 2018

# Abstract

It is common that oxygen is a limited factor in microbial decomposition of a substance. Biostimulation with oxygen release compound, increase dissolved oxygen in groundwater and stimulate natural decomposition of petroleum hydrocarbon. Many places today are contaminated and using biostimulation with oxygen release compound will probably increase in the future. Today, the knowledge about what happens with microorganism is insufficient. This study will contribute to increase the knowledge. This study has investigated if the bacteria growth and enzyme activity increase when oxygen release compound use in toluene contaminated ground water in southern Sweden. Groundwater that has been treated with oxygen release compounds and groundwater that had not treated were analysed. This study shows that there is a difference between groundwater pipes but no difference in bacteria growth and enzyme activity between treated ground water and non treated. The result can depend on the difference in environmental conditions. The study shows that treatment with oxygen release compound not always will impact the bacteria growth and enzyme activity. More study is needed to investigate if the microorganism changes differently in different sites during treatment with oxygen release compound and what environmental factors has a large impact.

Keyword: biostimulation, oxygen release compound, ORC, ORM, in situ, toluene.



# Innehållsförteckning

**Abstract 3**

**Innehållsförteckning 5**

**Inledning 7**

**Metod 11**

- Omgivningsbeskrivning 12
- Åtgärder 14
- Laboratoriestudie 15
- Statistisk analys 19

**Resultat 21**

- Bakterietillväxt 22
- Enzymaktivitet 23
- Totala biomassan och mikrobiella samhällets komposition 24

**Diskussion 25**

**Slutsats 33**

**Tack 35**

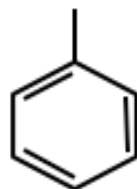
**Referenser 37**

**Bilaga 41**



# Inledning

I Sverige finns det cirka 25 000 förorenade områden. Enligt miljö kvalitetsmålet Giftfri miljö ska förorenade områden åtgärdas i så stor utsträckning att de inte utgör någon risk för människors hälsa eller miljön, vilket medför att det finns ett flertal områden i Sverige som behöver åtgärdas (Nilsson, 2017). En förorening som förekommer i jord och grundvatten är toluen (Gleisner, 2017). Toluen är ett mono-aromatiskt kolväte som ofta används som lösningsmedel inom gummi- och kosmetikaindustrin (Figur 1). I ren form är toluen en färglös klar vätska som har en aromatisk lukt (Prevent, 2018). Ämnet har en låg löslighet i vatten samt har en lägre densitet (LNAPL; Light Non- Aqueous Phase Liquid) vilket gör att toluen sjunker ner igenom markprofilen till grundvattenytan eller ogenomsläppliga jordarter för att sedan spridas horisontellt (Padgett et al., 2017; SGF-Åtgärdsportalen, 2018b). Toluen ger negativa effekter på människors och djurs centrala nervsystem både vid akuta och kroniska exponeringar och därför är det viktigt att minska exponeringen av ämnet (Toxics, 2018).



**Figur 1.** Kemisk formel för toluen, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>.

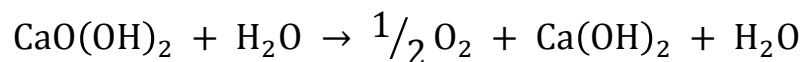
På företaget Bostiks verksamhetsområde och intilliggande Helsingborgs hamn finns höga halter av toluen i grundvattnet. För att minska risken för negativa effekter på människors hälsa och miljö pågår ett projekt med åtgärder för att minska halten toluen i grundvattnet (Tyréns, 2016a; Tyréns, 2016b). En vanlig metod i Sverige är att gräva upp den förorenade jorden och lägga jorden på deponi eller att behandla och placera jorden på en annan plats (Nilsson, 2017). Vid grundvatten med organiska

föroreningar är det vanligt att grundvattnet pumpas upp och renas för att sedan återinjekteras i grundvattenzonen alternativt avledas till närliggande recipient eller dagvattenbrunn (SGF-Åtgärdsportalen, 2017). Ett alternativ till de traditionella behandlingsmetoderna för förorenad jord och grundvatten är att genomföra behandlingen på plats nere i marken, *in situ*. Några metoder är exempelvis jordtvätt, fytosanering, kemisk oxidation, övervakad naturlig nedbrytning och biostimulering, men dessa metoder används sällan (SGF-Åtgärdsportalen, 2015a; SGF-Åtgärdsportalen, 2015b).

Vid biostimulering tillförs en elektronacceptor, elektrondonator eller näringsämnen för att stimulera de naturligt förekommande mikroorganismerna i miljön (Kanisser and Sims, 2011). Mikroorganismerna använder föroreningarna för att erhalla energi och material för cellsyntes som bygger på biomassan (Scherer et al., 2010; Yeh et al., 2010). För en mikrobiell populations tillväxt är faktorerna temperatur, syre, fuktighet, pH-värde, kväve- och fosforhalt viktiga men även vilka kemikalier som är närvarande och i vilka koncentrationer dessa har (Milic et al., 2009; Vinås et al., 2005). Grundvatten kan ha låga halter av lösligt syre i kontaminerade områden vilket medför att anaeroba förhållanden uppstår och den biologiska nedbrytningen samt biomassans tillväxt reduceras (Lee et al., 2007; Liu et al., 2006).

Mikroorganismer som bryter ner toluen har en högre nedbrytningshastighet under aeroba förhållanden. Genom att använda syre som elektronacceptor vid biostimulering minskas det anaeroba tillståndet och den mikrobiella aktiviteten stimuleras och underhålls (Scherer et al., 2010). Syre kan tillsättas med olika metoder. En metod är air sparging som innebär att luft pumpas ner i grundvattenzonen (SGF-Åtgärdsportalen, 2018a). En passiv metod för att öka syrehalten vid efterbehandling av petroleumkolväten i grundvatten och mättade jordar är att stimulera den biologiska nedbrytningen med ett långsamt syreavgivande medel (ORC; oxygen released compound). Denna metod kan även användas på platser där schaktning och pumpning inte är möjligt. ORC är ett kalciumhydroxidbaserat preparat som blandas med vatten och injekteras ner i marken. Vid kontakt med vatten blir preparatet hydratiserat och det sker en frisättning av molekylärt syre ( $O_2$ ), kalciumhydroxid ( $Ca(OH)_2$ ) och vatten ( $H_2O$ ) (Figur 2) (Regenesis, 2018). Preparatet innehåller även fosfat för att sakta ner reaktionen (Schäfer et al., 2006).





**Figur 2.** Visar vad som sker när ORC kommer i kontakt med vatten.

För att minska halterna av toluen i grundvattnet vid Bostik och Helsingborgs hamn har kemisk oxidation och biostimulering använts. Kemiskt oxidationsmedel har injekterats i områden där toluenhalterna är för höga för att erhålla effektiv bakteriell nedbrytning (Tyréns, 2017). Det kemiska oxidationsmedlet reducerar halten toluen under en månads tid (Shore, 2018). När halten toluen har minskats ökar den bakteriella nedbrytningen som har stimulerats med ORC. ORC uppskattas öka nedbrytningen under 9-12 månader (Regenesis, 2018; Tyréns, 2017).

Idag finns flera studier som visar på en minskad toluenhalt vid användning av ORC, men få studier har undersökt hur effekten är på det inhemska mikrobiella samhället (Nebe et al., 2009; Richardson et al., 2012). Tidigare studier har visat att när  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  framställs vid användning av ORC kan det resultera i en pH-ökning i vattnet (Parreira et al., 2011; Yeh et al., 2010). Ett högre pH-värde kan hämma bakterietillväxten samt minska mikrobers enzymatiska aktivitet och den biologiska nedbrytningshastigheten (Parreira et al., 2011; Scherer et al., 2010; Yeh et al., 2010). För att undvika högre pH-värde kan syreavgivande medel användas i miljöer som har en hög buffringskapacitet eller där pH kan regleras och kontrolleras (Parreira et al., 2011; Scherer et al., 2010; Yeh et al., 2010). Studier visar att efterbehandling med ORC kan medföra en ökning av antioxidantenzymers aktivitet och enzyms nedbrytningshastighet i organiskt rika system (Gallizia et al., 2004; Li et al., 2015; Vezzulli et al., 2004). Vid rätt förhållanden kan det förekomma så mycket som en tredubblad ökning av den totala mikrobiella biomassan vid behandling med syreavgivande medel i grundvatten och mättade jordar jämfört med liknande obehandlade områden (Arienzo, 2000; Ringelberg et al., 2001). Toluen-nedbrytande mikrobiella samhällens biomassa ökar upp till en viss koncentration av föroreningen (80 mg/L toluen) och därefter minskar biomassans tillväxt (Yeh et al., 2010). Det beror på att föroreningen blir toxisk för mikroorganismerna vid en viss koncentration av toluen i grundvattnet. Föroreningen blir då en hämmande faktor och tillväxten av mikroorganismer blir lägre jämfört med en lägre koncentration av toluen i grundvattnet (Yeh et al., 2010).

Tillförsel av syre i tidigare anaeroba förhållanden förändrar det mikrobiella samhället och det förekommer en högre bakteriell mångfald (Gallizia et al., 2004; Richardson et al., 2012; Singleton et al., 2013). Dock har miljöförhållandena på platsen inverkan på hur bra resultatet blir vid

användning av ORC. Ett exempel på att resultatet av behandling blir olika beroende på var den genomförts är när ORC användes i ett källområde där det fanns underjordiska lagringstankar (Landmeyer and Bradley, 2003). Under lagringstankarna blev det ingen förändring av mängden lösligt syre och oförändrat lågt antal aeroba och fakultativt anaeroba bakterier. Injekttering gjordes även 200 meter nedströms källområdet. Nedströms källområdet blev resultatet en ökning av mängden lösligt syre och ett ökat antal aeroba och fakultativt anaeroba bakterier. Förändringar i mängden lösligt syre och den mikrobiella strukturen efter behandlingen relateras till skillnader i hydrologiska och geokemiska förhållanden. Exempelvis var förhållandena i källområdet ofta anaeroba men blev aerobt efter regn (Landmeyer and Bradley, 2003).

Användningen av ORC kommer förmodligen öka i framtiden. Därför är det viktigt att ha mer kunskap om vad som händer i markmiljön vid användning av ORC. Trots att mikrobiell nedbrytning är en av de viktigaste processerna vid naturlig nedbrytning av föroreningar finns det fortfarande lite kunskap om vad som sker under efterbehandlingen. Syftet med den aktuella studien är att öka kunskapen om biostimulering med ORC genom att utvärdera vilken effekt ORC har på mikroorganismerna i grundvattnet. Förändras det mikrobiella samhället, mängden mikroorganismer och enzymaktiviteten vid användning av ORC i grundvattnet.

I denna studie är hypoteserna:

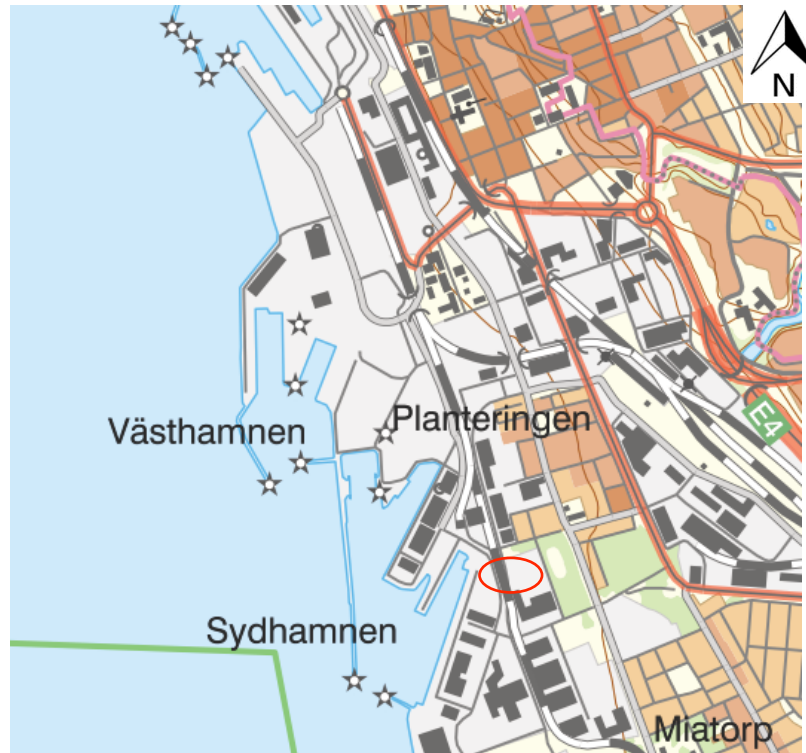
- Bakterietillväxten i grundvatten ökar vid användning av ORC.
- Enzymaktiviteten i grundvatten ökar vid användning av ORC.
- Totala biomassan ökar vid användning av ORC i grundvatten.
- Kompositionen av det mikrobiella samhället förändras vid användning av ORC i grundvatten.

I studien utvärderas hypoteserna genom att analysera grundvatten från Bostiks verksamhetsområde och intilliggande Helsingborgs hamn. I grundvattnet analyseras totala biomassan, kompositionen av det mikrobiella samhället, bakterietillväxt samt peroxidas och fenoloxidas enzymaktivitet från behandlade och obehandlade platser.

# Metod

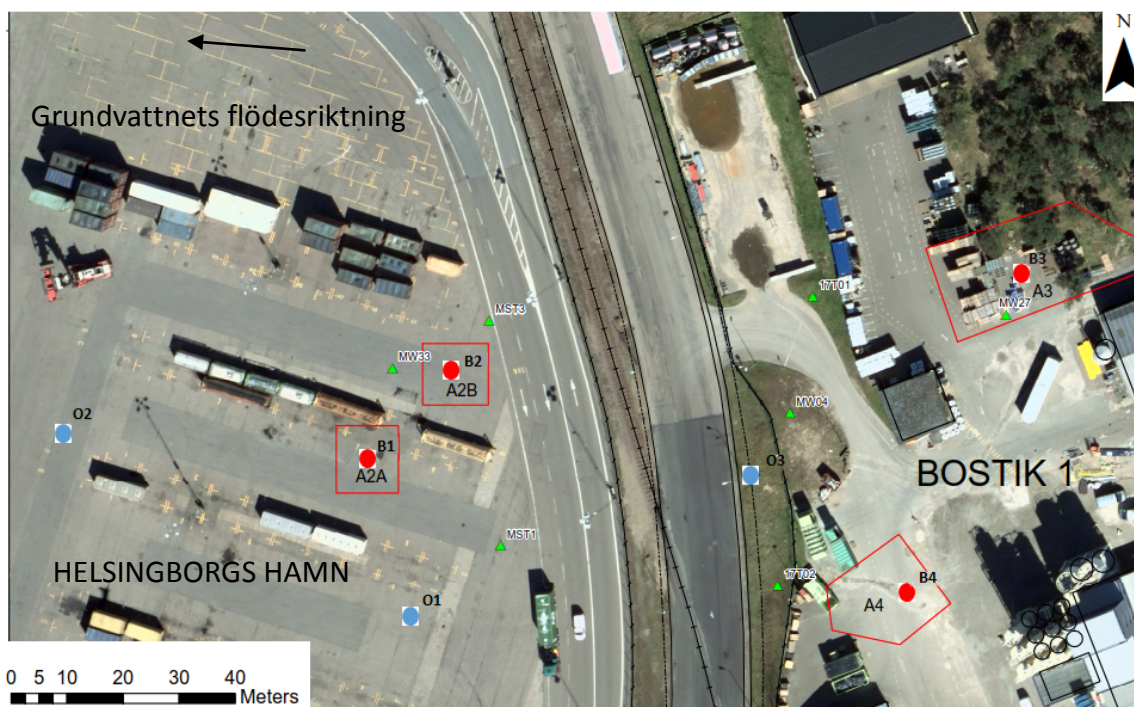
Bakterietillväxten, enzymaktiviteten, totala biomassan och kompositionen av det mikrobiella samhället analyserades i grundvatten från Bostiks verksamhetsområde och Helsingborgs hamn. Nedan beskrivs området, vilka åtgärder som genomförts samt metodiken för studien.

## Omgivningsbeskrivning



**Figur 3.** Översiktskarta över delar av Helsingborg. Det undersökta området är markerat med röd ring. Tillstånd för bild finns av © Lantmäteriet (2018).

Det studerade området ligger i Helsingborg (Figur 3). I området är grundvattnets flödesriktning västlig ner mot Öresund (Figur 4). I provtagningsområdet inom Bostiks verksamhetsområde består det översta jordlagret ner till cirka 2,5 meters djup av fyllnadsmaterial bestående av sand och grus. Längre ner återfinns naturligt material i form av sand. Grundvattenytan är cirka 4 meter under markytan (Tyréns, 2016a).



**Figur 4.** Flygbild över Bostisks verksamhetsområde och intilliggande område i Helsingborgs hamn där den troliga föroreningen är belägen. Behandlade områden A2A, A2B, A3 och A4 ligger inom de rödmarkerade rutorna. Röda punkter markerar provpunkter som är behandlade med ORC Advanced® och blå punkter markerar provpunkter som inte behandlats med ORC Advanced®. Gröna punkter markerar grundvattenrör som inte används i denna studie. Tillstånd för bild finns av Lindenbaum, J (2018).

I det aktuella området inom Helsingborgs hamn består det översta jordlagret ner till cirka 1,8 meters djup av fyllnadsmaterial i form av sand och grus. Jordlagret under cirka 1,8 meters djup består av naturligt material av sand med fläckvis organiska skikt (Tyréns, 2017). Grundvattenytan ligger cirka 1,5 meter under markytan (Tyréns, 2016a).

## Åtgärder

Företaget Bostik i Helsingborg tillverkar lim och tätnings- och byggprodukter. Vid markundersökningar inom Bostiks verksamhetsområde och ett intilliggande område i Helsingborgs hamn detekterades halter av toluen och alifater (C5-C10) över de specifika åtgärds målen i grundvattnet. De specifika åtgärds målen för området är 80 mg/L toluen, 42 mg/L alifater C5-C8 och 1,2 mg/L alifater C8-C10 (Tyréns, 2016a; Tyréns, 2016b).

I juni 2017 inleddes åtgärder på fyra platser inom Bostiks verksamhetsområde och det intilliggande området i Helsingborgs hamn för att minska föroreningshalten i grundvattnet (Figur 4). Åtgärderna bestod av biostimulering med ORC, med substratet ORC Advanced<sup>®</sup>, och kemisk oxidation, med substraten RegenOX<sup>®</sup> och PersulfOX<sup>®</sup> (Tabell 1) (Toft, 2017). Åtgärderna som inleddes var första fasen åtgärder av ett antal faser, som pågår tills åtgärds målen uppnås. Andra fasen påbörjades några månader efter denna studies provtagning gjordes (Tyréns, 2017).

**Tabell 1.** Visar källområdenas area (m<sup>2</sup>), mängd injekterat ORC Advanced<sup>®</sup>, RegenOX<sup>®</sup> och PerfluxOX<sup>®</sup> (kg) i källområdena samt antal dagar mellan injektering av substrat och provtagning av grundvatten för respektive källområde (Tyréns, 2017; Regenesi, 2017a; Regenesi, 2017b; Regenesi, 2017c; Regenesi, 2017d; Regenesi, 2017e)

Källområde	Area (m <sup>2</sup> )	Mängd ORC Advanced <sup>®</sup> (kg)	Mängd RegenOX <sup>®</sup> (kg)	Mängd PerfluxOX <sup>®</sup> (kg)	Antal dagar
A2A	128	275		1700	243
A2B	128	400	1203		242
A3	227	1550	3086		246
A4	495	750			247

Injekteringsrör placerades på varierande djup med fyra meters mellanrum inom de aktuella områdena. Preparaten blandades med vatten och tillfördes i injekteringsrören med en stav. Vid källområde A2A trängde preparatet upp via röret och i marken i närheten av injekteringspunkten, på grund av mättnad i marken. Uppträngningen av preparaten medförde att endast 69 % av den planerade mängden ORC Advanced<sup>®</sup> och 85 % PersulfOX<sup>®</sup> kunde injekteras (Toft, 2017).

Efter injekteringen av ORC Advanced<sup>®</sup> har det genomförts regelbunden provtagning av grundvattnet i området. Provtagningarna har gjorts i grundvattenrör som har filterrör placerade i grundvattnet (Toft, 2017). Vid de grundvattenprovtagningar som utfördes under år 2018 uppmättes halter över de specifika åtgärds målen för toluen. Uppmätta

halter av alifater C5-C8 och C8-C10 uppfyllde de specifika åtgärds målen för området (Eurofins, 2018; Tyréns, 2017).

### Laboratoriestudie

I studien gjordes vattenprovtagning av grundvatten i grundvattenrör i områden som injekterats med ORC och i grundvattenrör där ingen injektering av ORC har gjorts. I grundvattnet analyserades bakterietillväxt, enzymaktivitet, total biomassa och mikrobiella samhällens komposition. Nedan presenteras metodiken för studien.

#### *Provtagning*



**Figur 5.** Uppställning av lod, peristaltisk pump och flödescell.

Grundvattenprovtagningen utfördes den 27 februari och 5 mars 2018 inom Bostiks och Helsingborgs hamns verksamhetsområden. Provtagningen gjordes i totalt sju grundvattenrör, B1, B2, B3, B4, O1, O2 och O3 (Figur 4). I varje grundvattenrör togs tre replikat. Grundvattennivån i grundvattenröret mättes med ett lod och vattenpelarens längd ( $l$ ) i röret beräknades med formel 1,

$$l_P = l_R - l_N \quad (1)$$

Där  $l$  är längd (m),  $P$  är vattenpelare,  $R$  är grundvattenrör och  $N$  är grundvattennivån i röret.

Toluen förekommer vid grundvattenytan och en bit ner, då ämnet har lägre densitet än vatten (LNAPL) (Padgett et al., 2017). Vid provtagning placerades därför änden av en grundvattenslang 50 till 100 cm under grundvattenytan. Grundvattenslangen monterades på en peristaltisk pump och flödescell (Figur 5). För att undvika att olika vattennivåer blandades under provtagning sattes pumpen på en låg pumphastighet, som gav en minimal sänkning av grundvattenytan. Avsänkningen kontrollerades med ett lod. Ungefär tre rörvolym vatten pumpades först upp för att få grundvattenprover som var representativa för de förhållanden som fanns i grundvattenmagasinet (SGF, 2013). Vattenvolymen i röret beräknades med ekvation 2.

$$V = l_p \cdot \pi \cdot r_R^2 \quad (2)$$

Där  $V$  är rörvolym vatten ( $m^3$ ),  $l$  är längd på vattenpelaren (m),  $r$  är innerradien på vattneröret (m),  $P$  är vattenpelare och  $R$  är grundvattenrör.

När den beräknade vattenvolymen pumpats upp noterades pH-värde och syrehalt som mättes med flödescellen. Därefter kopplades flödescellen ur och änden på grundvattenslangen, som var kopplad till flödescellen, tvättades med grundvattnet för att minska kontaminering av ämnen som inte fanns i grundvattnet. För att minska risken för att toluen skulle övergå till gasfas togs luftbubblor i slangen bort genom att slå på slangen. En 2 dl mörk glasflaska och tre 1 L mörka glasflaskor fylldes med vatten genom att slangen placerades i botten på glasflaskorna. För att minska andelen vatten som varit i kontakt med luften rann vatten ut ur flaskan i 30 sekunder innan korken sattes på. För att bevara proverna placerades de fyllda flaskorna i kylväskor. Grundvattnet i grundvattenrören O3 och B1 hade vid tidigare vattenanalyser uppvisat toluenhalter som var mer än dubbelt så höga som de specifika åtgärds målen för området. Därför samlades överflödigt grundvatten från dessa grundvattenrör in och togs om hand. De små 2 dl flaskorna med grundvatten skickades för analys av bland annat toluen och alifater i grundvattnet till Swedac ackrediterade laboratoriet Eurofins. Resterande vattenprover transporterades till Lunds universitet och placerades mörkt i en kyl (4 °C).



### *Bakterietillväxt*

Bakteriernas tillväxthastighet mättes genom leucininkorporering (Smith and Azam, 1992). Metoden anpassades till grundvatten enligt Hernandez et al. (2016). 1,5 mL grundvatten tillsattes i 2 mL eppendorf rör med en rund botten, så bakteriellt pellets stannade på sidan av röret. Total användes två eppendorf rör per replikat. I ett prov från varje replikat tillsattes 75 µl 100 % triklorättiksyra (TCA) med en slutlig koncentration 5 %. TCA tillsattes för att stoppa bakterieproduktionen vid start av laborationen. Dessa prover fungerade som kontroller för att korrigera för bakgrundsabsorptionen av radioaktivitet. I samtliga prover tillsattes 30 µL av <sup>3</sup>H-leucin-lösning, bestående av 4 µL <sup>3</sup>H-leucin och 26 µl destillerat vatten med en slutlig koncentration på 40 nM. Lock sattes på provrören varefter proverna vortexades i 5 sekunder. Därefter inkuberades proverna under sex timmar i mörker och rumstemperatur (22 °C). Under inkuberingen får bakterierna möjlighet att ta upp radioaktivt leucin och inkorporera det i sitt protein. Det är det inkorporerade leucinet som används för att uppskatta en relativ tillväxthastighet. Efter inkubering tillsattes 75 µl 100 % TCA i de prover som tidigare inte erhållit TCA, proverna vortexades i fem sekunder varefter alla prover placerades i kylan (4 °C).

Dagen efter placerades proverna i en bänkcentrifug med rörgångjärnen placerade in mot mitten, så den bakteriella pelletsen hamnade på samma ställe i varje provrör. Proverna centrifugerades med 13 000 varv/min i 8 minuter. Vätskan avlägsnades med en glaspipett som kopplades till ett aspirationssystem. Därefter tillsattes 1,5 µL 5 % TCA och proverna vortexades i 5 sekunder. Centrifugeringen och avlägsnandet av vätska upprepades en gång till. 1,5 mL etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) tillsattes och vortex, centrifugering samt avläsning av vätska upprepades igen. 0,2 mL 1 M natriumhydroxid (NaOH) tillsattes och proverna vortexades tills bakteriella pelletsen lösts upp. Proverna placerades i ett värmeskåp (90 °C) under 30 minuter och kylde därefter i 10 minuter i frysen. 1 mL scintillations cocktail tillsattes och proverna vortexades tills lösningen blev klar. Den relativa aktiviteten räknades med en scintillator räknare på program 7, <sup>3</sup>H program. Bakterietillväxten beräknades med formel 3.

$$B = S/(V_{vatten} \cdot t) \quad (3)$$

Där  $B$  är bakterietillväxten (DMP/(mL·h)),  $S$  är relativ aktivitet (DMP),  $V_{vatten}$  är provvolym vatten (mL) och  $t$  är inkuberingstid (min).

### *Enzymaktivitet*

De två enzymerna fenoloxidas och peroxidas enzymaktivitet mättes med hjälp av att använda DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanin) (Sinsabaugh and Linkins, 1988). 180 mg DOPA (20mM) blandades med 91,3 mL buffert (natriumacetat) så den slutliga koncentrationen DOPA blev 10 mM. Lösningen skakades i 10 minuter för att lösa upp DOPA. 1 mL grundvatten och 1 mL DOPA lösning tillsattes i ett 2 mL eppendorf rör, totalt tre replikat per provflaska. Tre kontroller gjordes med 1 mL buffert och 1 mL DOPA. Proverna skakades i 10 minuter för att blandas och därefter centrifugerades proverna i fem minuter (10 000 varv/min). 250 µl av varje prov flyttades till två mikrotiterplattor, en för att mäta enzymaktiviteten för peroxidas och en för fenoloxidas. På plattan som mätte peroxidas enzymaktiviteten tillsattes även 10 µl 0,3 % väteperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i varje prov. Sedan mättes absorptionen fotometriskt (450 nm) och därefter inkuberades mikrotiterplattorna i rumstemperatur (22 °C) och mörker under 20 timmar. Efter inkubering mättes absorbans fotometriskt (450 nm) igen. Enzymaktiviteten beräknades med formel 4. Som extinktionskoefficient användes värdet 7,9 µmol<sup>-1</sup>.

$$E = \frac{(A_{t_1} - A_{t_0} - A_k)}{t \cdot V \cdot \text{Extinktionskoefficient}} \quad (4)$$

Där  $E$  är enzymaktiviteten (mol/mL·h),  $t$  är inkuberingstiden (h),  $V$  är provvolymen och  $A$  är absorbansen (mol) innan inkubering ( $t_0$ ), efter inkubering ( $t_1$ ) och i kontrollen ( $t_k$ ).

### *Total biomassa och mikrobiella samhällets komposition*

Fosfolipider i celler bryts ner snabbt när en organism dör. Detta gör att den totala mängden fosfolipider kan användas som ett mått på levande biomassa (Green and Scow, 2000). Totala biomassan och förändringar i mikrobiella samhället studerades genom en fosfolipidsyra analys (PLFA).

För att överstiga analysgränsen vid analys med gaskromatograf (GC) filtrerades grundvattnet genom ett mikrobiellt filter (0,22 µm) med tryck (100 mbar). Mängden vatten som filtrerades varierade beroende på koncentrationen av partiklar i vattenproven (Lhotsky et al., 2017; Pfiffner et al., 1997). Efter filtrering extraherades lipiderna från filtren med en enfas blandning. Filtren placerades i stora provrör och 15 mL Bligh and Dyer (kloroform:metanol:citronsyra buffert, 1:2:0,8 v/v/v) tillsattes i provrören. Citronsyrabufferten som användes bestod av 31,25 g citronsyra, 1 liter destillerat vatten och 40 bitar av NaOH. Proverna skakades i 1 min och ställdes därefter i rumstemperatur så lipiderna kunde extraheras.

Efter två timmar tillsattes 4 mL kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) och 4 mL citronsyrabuffert och därefter skakades proverna i en minut. Proverna stod över natten för att separeras till två faser, en  $\text{CHCl}_3$ -fas som innehöll lipider och en fas med metanol och vatten som bland annat innehöll kolhydrater och protein. Efter separering togs 4,5 mL lipidextrakt ut till nya provrör och placerades på ett värmeblock (40 °C). Extraktet evaporerades med hjälp av kväve.

Därefter separerades lipider i olika lipidklasser. Det gjordes genom att det torra materialet i provröret löstes upp med 100  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$  och provröret vortexades i 15 sekunder. Vätskan förflyttades till kiseldioxidkolonner och proceduren med  $\text{CHCl}_3$  och flyttning upprepades igen. Därefter tvättades neutrala lipider och glykolipider ut med 1,5 mL  $\text{CHCl}_3$  respektive 6 mL aceton ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ ). I nästa steg tvättades fosfolipiderna ut med metanol (MeOH) ner i rena provrör. Metanolvätskan evaporerades med kväve och värme (40 °C).

De bundna fettsyror separerades från fosfolipiderna och överfördes till metylestrar som senare analyserades. Separeringen gjordes genom att tillsätta 50  $\mu\text{L}$  19:0 internal standard, som bestod av 0,023 mg/mL hexan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), till provrören. Vätskan evaporerades med kväve. Proverna löstes upp med 1 mL toluen:metanol lösning (1:1 v/v) i varje provrör som sedan vortexades i 5 sekunder. 1 mL 0,2 M kaliumhydroxid (KOH) tillsattes i metanollösningen och proverna inkuberades i ett vattenbad (37 °C) under 15 min. När proverna svalnat lite tillsattes 2 mL  $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CHCl}_3$  lösning (4:1 v/v), 0,3 mL 1 M ättiksyra (HAc) och 2 mL vatten för att separera innehållet i två faser. Proverna vortexades i en minut samt centrifugerades (3000 varv/min) under fem minuter. Därefter överfördes den översta fasen till nya provrör och vätskan i de nya provrören evaporerades under kväve. När evaporering var klar löstes materialet upp med 100  $\mu\text{L}$   $\text{C}_6\text{H}_{14}$  och proverna vortexades. 100  $\mu\text{L}$   $\text{C}_6\text{H}_{14}$  fylldes i små GC-rör och innerhöljet sattes i. I innerhöljet placerades 30  $\mu\text{L}$  av provlösningen. Analys med GC gjordes med två kontroller som endast innehöll  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  för att analysera bakgrundshalten.

### Statistisk analys

Alla beräkningar gjordes i Excel och SPSS. För jämförelse mellan grundvatten behandlat med ORC och inte behandlat med ORC gjordes ett t-test. Vid testet användes medelvärden av bakterietillväxten och enzymaktiviteten i varje grundvattenrör. Statistiskt signifikant bestämdes till  $p < 0,05$ . För att ta hänsyn till bakgrundsvariationen vid jämförelse mellan med och utan ORC i grundvattnet undersöktes möjligheten att göra

en analys av kovarians (ANCOVA) med toluenhalten och syrehalten i grundvattnet som kofaktorer.

En envägs variansanalys (ANOVA) användes för att studera skillnader mellan provpunkterna. Vid testet användes samtliga provpunkters replikat. Den undersökta variabeln användes som beroende faktor och provpunkter som fast faktor. Varians kontrollerades med Levene's test. Normalfördelning kontrollerades med Kolmorov- Smirnovs test. Vid statistiskt signifikant ( $p < 0,05$ ) gjordes ett post hoc- test (Tukey) för att se vilka punkter som skilde sig åt. Vid ingen normalfördelning och heterogen varians loggades den beroende faktorn.

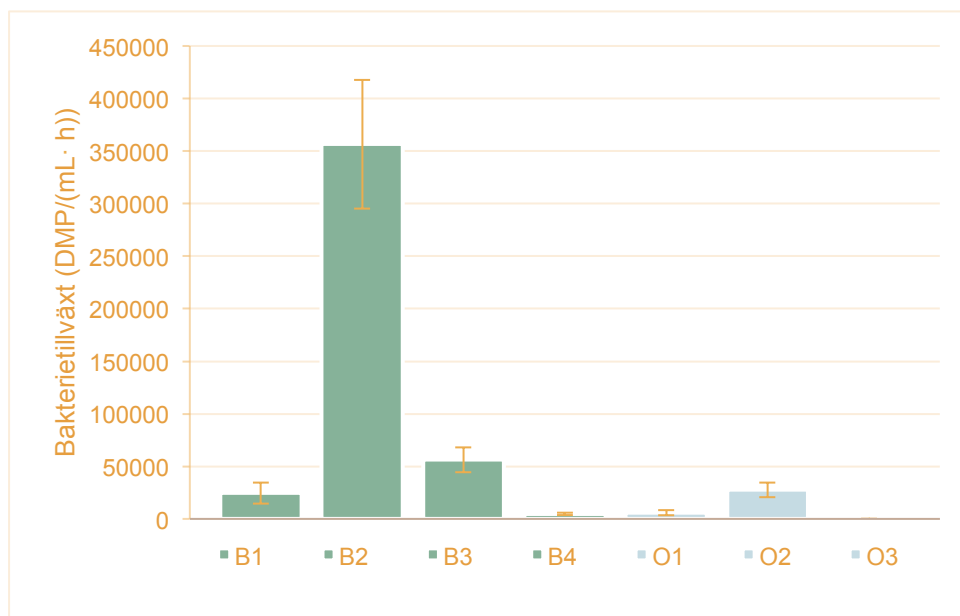
# Resultat

Toluenhalten i det insamlade grundvattnet varierade mellan 0,001 mg/L och 290 mg/L (Tabell 2). Högsta toluenhalten uppmättes i grundvattenrör O3, där ingen ORC hade tillförts. Syrehalten i grundvattnet varierade från 0,25 mg/L i grundvattenrör B3 till 1,5 mg/L i grundvattenrör O3. I samtliga grundvattenrör låg pH-värdet mellan 6,3 till 7,1 vid den aktuella tidpunkten som provtagningen genomfördes (Tabell 2).

**Tabell 2.** Visar vilka grundvattenrör som behandlades med ORC samt toluenhalt (mg/L), syrehalt (mg/L), pH, bakterietillväxt (DMP/(mL·h)), peroxidas enzymaktivitet (nmol/(mL·h)) och fenoloxidas enzymaktivitet (mmol/(mL·h)) i varje grundvattenrör.

Grundvattenrör	Behandlad med ORC	Toluen (mg/L)	Syrehalt (mg/L)	pH	Bakterietillväxt (DMP/(mL·h)) (±SD)	Peroxidas enzymaktivitet (nmol/(mL·h)) (±SD)	Fenoloxidas enzymaktivitet (mmol/(mL·h)) (±SD)
B1	X	140 (±42)	0,6	6,3	24600 (± 10000)	3,1 (±0,12)	0,69 (±0,03)
B2	X	0,001 (±0,00030)	1,2	7,0	357000 (±61400)	6,0 (±0,14)	1,4 (±0,05)
B3	X	0,0025 (±0,00075)	0,3	7,1	56300 (±11900)	3,3 (±0,17)	0,69 (±0,03)
B4	X	1,4 (±0,42)	0,4	6,3	4710 (±1070)	0,80 (±0,13)	0,18 (±0,01)
O1		0,0035 (±0,0011)	0,5	6,3	5870 (±2670)	0,98 (±0,08)	0,22 (±0,02)
O2		0,0074 (±0,0022)	0,6	6,3	27700 (±6990)	11 (±0,36)	2,3 (± 0,2)
O3		290 (±87)	1,5	6,3	65,0 (±34,0)	2,4 (±0,13)	0,51 (± 0,03)

## Bakterietillväxt



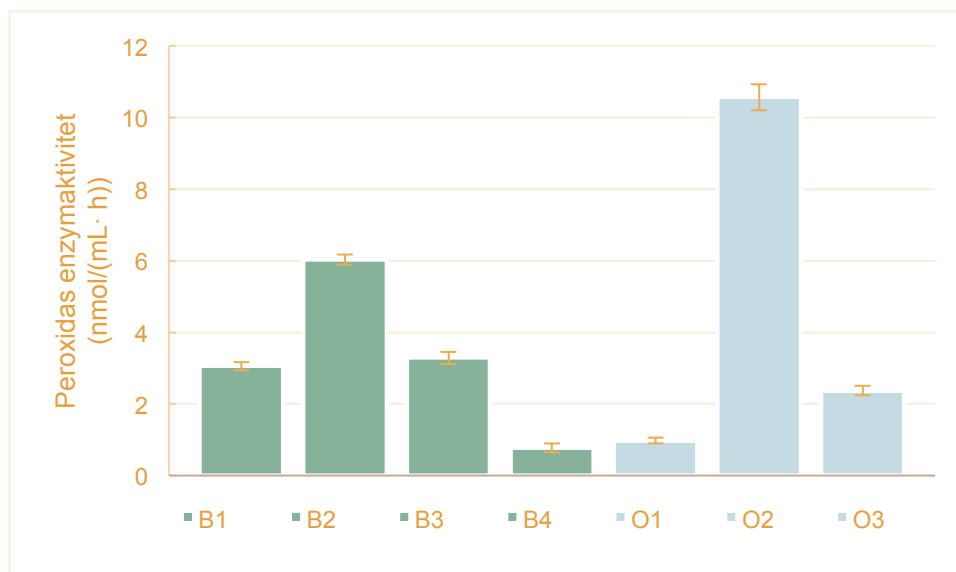
**Figur 6.** Visar bakterietillväxten  $\pm$  standardavvikelsen (DMP/(mL·h)) i grundvattenrören. Där felstaplar inte syns är standardavvikelsen liten.

Högst bakterietillväxt uppmättes i grundvattenrör B2, där behandling av ORC genomförts (Figur 6). Lägsta bakterietillväxten uppmättes i grundvatten från grundvattenrör O3 med en bakterietillväxt på 63 DMP/(mL·h) (Tabell 2). Det fanns en signifikant skillnad ( $p < 0,05$ ) i bakterietillväxt mellan grundvattenrören visar en envägs ANOVA. De grundvattenrör där bakterietillväxten inte skiljer sig åt är grundvattenrören B3 och B1, B3 och O2, B1 och O2 samt B4 och O1 visar ett post hoc- test (Tukey).

Det observerades ingen signifikant skillnad ( $p=0,35$ ) i bakterietillväxt mellan grundvattenrör placerade i områden som behandlats med ORC och områden som inte behandlats med ORC visar ett t-test. Bakgrundsvariationen av syre och toluen i grundvattnet påverkade inte bakterietillväxten, då antaganden som homogen regression och normalfördelning inte uppfylls för att göra en ANCOVA med kofaktorerna syre och toluen.

## Enzymaktivitet

### Peroxidas enzymaktivitet

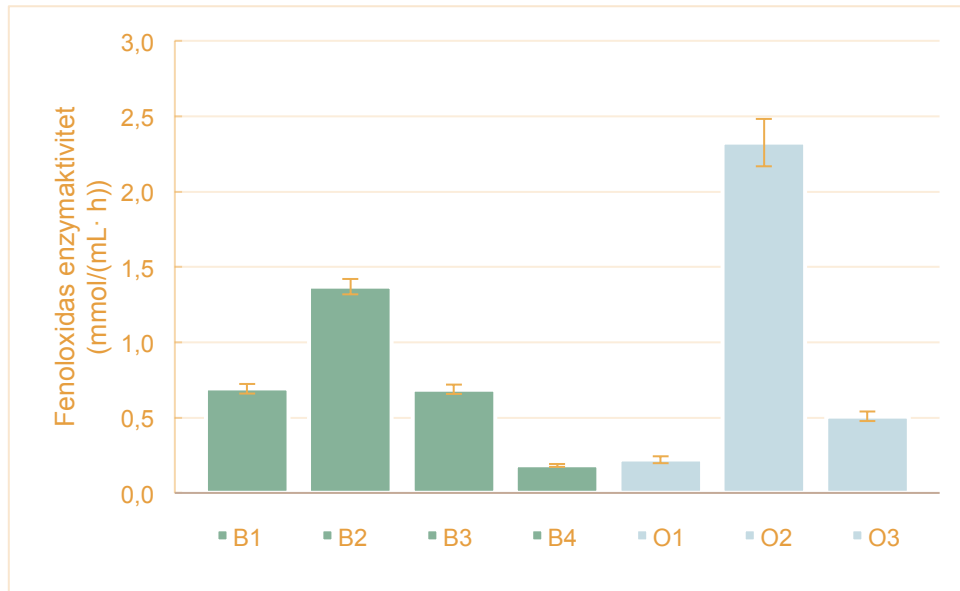


**Figur 7.** Visar peroxidas enzymaktiviteten (nmol/(mL·h)) ± standardavvikelsen i grundvattenrören.

Det fanns en signifikant skillnad ( $p < 0,05$ ) i peroxidas enzymaktivitet mellan grundvattenrören visar en envägs ANOVA. Högsta peroxidas enzymaktiviteten förekom i grundvattenrör O2 med 10,6 nmol/(mL·h). Lägsta peroxidas enzymaktivitet var i grundvattenrör B4 och O1 (Figur 7). Signifikant skillnad ( $p < 0,05$ ) i peroxidas enzymaktivitet fanns mellan samtliga grundvattenrör förutom i grundvattenrör B1 och B3 samt B4 och O1, visar ett post hoc- test (Tukey).

Det fanns ingen signifikant skillnad ( $p=0,65$ ) i peroxidas enzymaktivitet mellan grundvattenrör i områden behandlade med ORC och områden som inte behandlats med ORC visar ett t-test. Bakgrundsvariationen av syre och toluen i grundvattnet påverkade inte peroxidas enzymaktivitet, då antaganden som homogen regression och normalfördelning inte uppfylls för att göra en ANCOVA med kofaktorerna syre och toluen.

### Fenoloxidas enzymaktivitet



**Figur 8.** Visar fenoloxidas enzymaktivitet (mmol/(mL·h)) ± standardavvikelsen i samtliga grundvattenrör.

Det fanns en signifikant skillnad ( $p < 0,05$ ) i fenoloxidas enzymaktivitet mellan grundvattenrören visar en envägs ANOVA. Högsta fenoloxidas enzymaktiviteten uppmättes i grundvattenrör O2 (Figur 8). Lägsta fenoloxidas enzymaktiviteten var i grundvattenrör B4 med en fenoloxidas enzymaktivitet på 0,18 mmol/(mL·h) (Tabell 2).

Ett t-test visar ingen signifikant skillnad ( $p=0,43$ ) i enzymaktivitet mellan grundvattenrör i områden som behandlats med ORC och områden som inte behandlats med ORC. Det kan inte tas någon hänsyn till bakgrundsvariationen av syrehalt och toluenhalt i vattnet, då antaganden som homogen regression och normalfördelning inte uppfyllts för en ANCOVA.

### Totala biomassan och mikrobiella samhällets komposition

Den totala biomassan i grundvattnet var under detektionsgränsen i samtliga prover, vid analys med PLFA. Kompositionen av det mikrobiella samhället gick inte fastställas då samtliga prover var under detektionsgränsen vid analys med PLFA.



## Diskussion

När bakterietillväxten studerades i grundvattnet vid Bostik och intilliggande Helsingborgs hamn observerades en signifikant skillnad i grundvattnets bakterietillväxt mellan flera grundvattenrör. Högsta bakterietillväxten observerades i ett behandlat grundvattenrör, B2, men det fanns ingen signifikant skillnad i bakterietillväxt mellan grundvatten där ORC injekterats och där ORC inte injekterats. Att det inte är någon signifikant skillnad mellan grundvatten behandlat med ORC och inte behandlat med ORC kan bero på att det är en stor variation i bakterietillväxt mellan olika rör inom de behandlade områdena och inom de obehandlade.

Variationen i bakterietillväxt mellan enskilda grundvattenrör kan bero på olika miljöfaktorer på provtagningsplatserna. Vid provtagningsstillfället mättes syrehalten i grundvattnet. Tidigare studier visar på att den ökade syrehalten i vattnet från ORC ökar bakterietillväxten (Chapman et al., 1997; Ringelberg et al., 2001). I den aktuella studien finns det ingen korrelation mellan syrehalten och bakterietillväxten i grundvattnet. Endast syre kan därmed inte förklara variationen i grundvattnets bakterietillväxt. De uppmätta syrehalterna i grundvattnet vid grundvattenrören B1 och B3 var vid provtagningsstillfället mycket högre jämfört med vid tidigare mätningar som gjorts efter injekteringen av ORC (Bilaga, Tabell B). I övriga grundvattenrör var syrehalten likvärdig med tidigare mätningar. Syrehalten i grundvattenrören B1 och B3 kan vara representativa för området, men det kan även vara en felmätning. Fel vid mätningen kan bero på att värdena på mätinstrumentet inte stabiliserats innan de noterades. Det kan också bero på fel vid kalibrering av flödescellen. Övriga grundvattenrörs syrehalter vid provtagningsstillfället varierar endast lite jämfört med tidigare mätningar vilket visar att kalibreringen av instrumentet bör göras på rätt sätt. Eftersom det är en liten skillnad mellan syrehalterna i vattnet vid tidigare mätningar i B1 och B3 så antas att en felmätning har gjorts. Tidigare uppmätta värden i B1 och B3 har därför använts i denna studie.

En annan faktor som kan påverka grundvattnets bakterietillväxt är halten föroreningar som förekommer i vattnet (Vinås et al., 2005). I grundvattnet på Bostiks verksamhetsområde och intilliggande

Helsingborgs hamn förekommer framförallt högre halter av toluen i grundvattnet (Tabell 2). Om toluen verkar hämmande beror på vilken koncentration som finns i grundvattnet (Vinås et al., 2005). Enligt Yeh et al. (2010) kan toluen verka hämmande för bakterier vid 80 mg/L. På Bostiks verksamhetsområde och Helsingborgs hamns område uppmättes en toluenhalt över 80 mg/L i två punkter, B1 och O3. Det grundvattenrör där bakterietillväxten kan ha hämmats av hög toluenhalt är grundvattenrör O3 (290 mg/L), som har en mycket låg bakterietillväxt jämfört med övriga punkter (Figur 6). I grundvattenrör B1, som har en toluenhalt på 140 mg/L, var bakterietillväxten lika hög som i B3 och O2. En anledning till att bakterietillväxten inte är lägre i B1 än i grundvattenrören B3 och O2 kan vara bra miljöförhållanden i grundvattnet. Om det är bra miljöförhållanden i grundvattnet skulle bakterietillväxten i grundvatten från grundvattenrör B1 varit högre vid en lägre toluenhalt. Att toluenhalten var under 80 mg/L i samtliga punkter förutom B1 och O3 kan vara en orsak till att ingen hänsyn till bakgrundsvariationen av toluen behövdes göras, enligt metodiken, vid jämförelse av bakterietillväxten vid behandling med ORC och ingen behandling med ORC. Variationen i bakterietillväxt mellan grundvattenrören kan inte förklaras av toluenhalten i grundvattnet.

Skillnaden i bakterietillväxt i grundvattnet mellan olika provtagningsplatser beror förmodligen på fler än en miljöfaktor och att miljöförhållandena är olika beroende på plats. Exempelvis hade det behandlade grundvattenröret B2 den högst uppmätta bakterietillväxten i grundvattnet under studien, vilket kan bero på bra miljöförhållanden med bland annat en högre syrehalt (1,2 mg/L) och en toluenhalt under 80 mg/L i grundvattnet. Förmodligen är även kväve- och fosforhalten i grundvatten vid grundvattenrör B2 högre, då grundvattenytan var belägen i sand med organiskt material. Näring är en viktig faktor för tillväxten av bakterier i både jord och akvatiska system, men vattnets näringsinnehåll studerades inte före injektering av ORC då syre ofta är den begränsande faktorn (Kirchman, 2012; Shore, 2018).

Eftersom endast föroreningshalten i grundvattnet undersöktes innan behandlingen med ORC påbörjades får bakgrundsvärden i grundvattnet uppskattas efter obehandlade grundvattenrörs värden. I de obehandlade punkterna är pH-värdet 6,3 vilket bör vara bakgrundsvärdet för området. Nackdelen med biostimulering med ORC på vissa platser är att pH-värdet i vattnet ökar, vilket kan påverka bakterietillväxten (Gallizia et al., 2004; Parreira et al., 2011; Yeh et al., 2010). I två behandlade punkter, B2 och B3, kan pH-värdet ökat något vid injektering av ORC. I studie av Parreira et al. (2011) hämmades bakterietillväxten när pH-värdet ökade från 7 till runt 8,4–9. På den aktuella studiens plats har ökningen i pH-värde varit

liknande, från pH-värde 6,3 upp till runt 8,6 - 9,2 i grundvattenrören B2 och B3 (Bilaga). Vid provtagningstillfället hade pH-värdet minskat till runt 7. Det uppskattas att ökningen av pH-värdet i B2 och B3 inte har påverkat bakterietillväxten negativt då bakterietillväxten är bland de högsta i de undersökta punkterna. Det uppmätta pH-värdet i de olika grundvattenrören vid provtagningstillfället kan inte förklara variationen av bakterietillväxt i grundvattnet.

Vattentemperatur är också en faktor som har stor påverkan på bakterietillväxten. Vilken temperatur som ger en högre bakterietillväxt beror på vilka bakterier som finns i vattnet. En högre temperatur ger ofta en högre bakterietillväxt (Kirchman, 2012). I det ytliga grundvattnet som användes i denna studie finns ofta årsvariationer i vattentemperaturen, som sedan avtar med djupet. Från 8 meter under markytan och djupare är vattentemperaturen mer jämn under året (SGU, 2013). Bakterietillväxten i vattnet som användes i denna studie kan därför variera under året. Under sommarhalvåret förekommer förmodligen en högre vattentemperatur och bakterietillväxt än på vintern. I denna studie gjordes analysen av bakterietillväxt i samma temperatur och därför kan inte temperaturskillnader i grundvattenrören förklara skillnaderna i den bakterietillväxt som uppmätts.

Även enzymaktiviteten i grundvattnet antas öka vid användning av ORC (Li et al., 2015). I denna studie var det en signifikant skillnad i enzymaktivitet mellan flera provpunkter, men ingen signifikant skillnad mellan grundvatten behandlat med ORC och inte behandlat med ORC. De grundvattenrör med högsta respektive lägsta peroxidas enzymaktivitet hade även högsta och lägsta fenoloxidas enzymaktivitet (Figur 7 och Figur 8). Det som skiljer de olika enzymaktiviteterna åt är att vid peroxidas enzymaktivitet är det ingen signifikant skillnad mellan grundvattenrören B4 och O1, vilket uppmättes vid fenoloxidas enzymaktivitet. Högsta enzymaktivitet uppmättes i det obehandlade grundvattenröret O2. Övriga obehandlade grundvattenrör hade en lägre enzymaktivitet än samtliga behandlade grundvattenrör förutom B4. B4 hade ingen skillnad i enzymaktivitet med grundvattenrör O1 och lägre enzymaktivitet än O3. Anledningen till att det inte är någon signifikant skillnad i enzymaktivitet mellan grundvatten behandlat med ORC och obehandlat kan bero på, som vid bakterietillväxt, variationen i enzymaktivitet mellan grundvattenrören inom områdena som behandlats och inom områden som inte behandlats med ORC.

Variationen i enzymaktiviteten kan bero på olika miljöfaktorer som syrehalt, pH-värde, föroreningar och näringsämnen i vattnet (Sinsabaugh, 2010; Snajdr et al., 2008). Denna studies mätningar visar att enzymaktiviteten inte ökat med ökad syrehalt. Studien visar även på att de

högre toluenhalterna i grundvattnet vid grundvattenrören B1 och O3 inte behöver vara hämmande för enzymaktiviteten, då enzymaktiviteten inte är lägre i dessa rör jämfört med övriga grundvattenrör. Även vid jämförelse med enzymaktivitet behövdes inte bakgrundsvariationerna av toluen tas hänsyn till vid jämförelse av grundvatten behandlat med ORC och obehandlat grundvatten. Skillnader i enzymaktivitet mellan grundvattenrören beror förmodligen inte enbart på toluenhalten och syrehalten i vattnet.

En annan faktor som kan påverka enzymaktiviteten är vattnets pH-värde (Sinsabaugh et al., 2008; Yeh et al., 2010). Ett optimalt pH-värde för ett enzym kan vara över flera pH-enheter och beror på vilket enzym som undersöks. För enzymerna peroxidas och fenoloxidas ökar aktiviteten med ett ökande pH-värde (Sinsabaugh et al., 2008). Den uppmätta enzymaktiviteten uppskattas inte variera med pH-värdet i grundvattnet. Om det skulle finnas ett mönster mellan enzymaktivitet och pH-värde skulle variationen i enzymaktiviteten vara liten och endast grundvattenrören B1 och B2 enzymaktivitet hade skiljt sig från övriga rör.

På samma sätt som vid bakterietillväxt i grundvatten påverkas enzymaktiviteten med vattentemperaturen (Kirchman, 2012). Enzymaktiviteten analyserades i samma temperatur, så skillnader i enzymaktivitet mellan grundvattenrör kan inte förklaras med variation i vattentemperatur. Det är svårt att avgöra om halter av olika näringsämnen i grundvattnet har påverkat enzymaktiviteten. Enzymaktiviteten i B2 är näst högst av de jämförda punkterna och ett högre näringsinnehåll kan vara en av flera förklaringar till det. Ingen av de nämnda miljöfaktorerna ovan kan ensamt förklara variationen i enzymaktivitet mellan olika platser vid Bostiks verksamhetsområde och Helsingborgs hamn. Det uppmätta resultatet beror troligen på mer än en faktor i grundvattnet och att förhållandena på de använda platserna är olika.

I grundvattenrör O2 förekom en högre syrehalt i grundvattnet (0,8 mg/L) två månader innan provtagningstillfället (Bilaga, Tabell A). Även syrehalten i grundvattnet vid O3 har ökat efter injektering av ORC. Det uppskattas att det injekterade ORC i grundvattnet från de behandlade områdena A2A och A4 kan ha transporterats med grundvattnet nedströms till grundvattenrör O2 och O3. ORC kan därför påverkat de obehandlade rören också. I de behandlade områdena B1, B3 och B4 har inte syrehalten i grundvattnet ökat som var förväntat. Förklaringen kan vara de hydrologiska och geokemiska förhållandena i marken.

Injekteringen av ORC som gjordes i det aktuella området ingår i den första av flera faser av åtgärder. Det är svårt att bedöma vilken effekt en åtgärd i första fasen kommer ha. Genom att införa åtgärder stegvis i flera faser anpassas metoderna till den specifika platsen för att nå de uppsatta

åtgärds målen (Toft, 2017). Att denna studie utfördes i första fasen av åtgärder och cirka 8 månader efter injektering kan vara en förklaring till varför det inte blev en skillnad i bakterietillväxt och enzymaktivitet mellan platser som injekterats med ORC och platser som inte injekterats. I de områden där grundvattnet behandlats med ORC injekterades i tre av fyra områden även ett kemiskt oxidationsmedel för att minska toluenhalten och främja den biologiska nedbrytningen i grundvattnet (Tabell 1). Kemisk oxidation är aktivt upp till en månad efter injektering. Efter två veckor har 80 % av medlet förbrukats (Shore, 2018). I det aktuella området injekterades oxidationsmedlet två gånger, andra gången var i samband med att ORC injekterades. Vissa kemiska oxidationsmedel kan påverka mikroorganismer negativt och lämna skadliga rester i marken (Regenesis, 2007). Enligt Regenesis (2007) som tillhandahåller produkterna ska de kemiska oxidationsmedlen som används vid den aktuella efterbehandlingen lämna mycket lite rester. Mikroorganismerna kan påverkas negativt av det använda kemiska oxidationsmedlen men mikroorganismerna återhämtar sig efter en kort period. 130 dagar efter att RegenOX® injekterats ska det inte vara någon skillnad i biomassa jämfört med före injektering av kemisk oxidation (Regenesis, 2007). Då provtagningen för denna studie gjordes cirka 245 dagar efter den sista behandlingen med kemisk oxidation borde inte biomassan i studien påverkats av behandlingen med kemisk oxidation. När bakterietillväxt och enzymaktivitet studeras i endast de behandlade grundvattenrören är det en högre bakterietillväxt och enzymaktivitet i grundvatten från de tre grundvattenrör där kemisk oxidation användes än i det grundvattenrör där endast ORC injekterats. Behandlade punkter består endast av fyra stycken och det går inte avgöra om kemisk oxidation har påverkat bakterietillväxt och enzymaktivitet i denna studie. För att ta reda på effekten från kemisk oxidation behövs fler provpunkter. Om kemisk oxidation ger en positiv effekt på bakterietillväxten och enzymaktiviteten kan det bero på att när föroreningarna bryts ner av kemiskt oxidationsmedel lämnas mer lättnedbrytbara produkter. Produkterna kan bakterierna bryta ner och använda som energi och kolkälla för att bygga på biomassa (Yeh et al., 2010).

En vanlig metod som används för att studera den totala biomassan i jord är att analysera fosfolipiderna (PLFA) (Kirchman, 2012). PLFA har tidigare används för grundvatten men i mindre uträkning än vid jord (Lhotsky et al., 2017; Pfiffner et al., 1997). Grundvatten har en lägre total biomassa än jord. För att mäta halter över detektionsgränsen vid analys av grundvatten behöver vattnet först filtreras för att öka koncentrationen av biomassa. Att ingen biomassa över detektionsgränsen kunde detekteras vid denna studie kan bero på att en mindre vattenvolym användes jämfört

med tidigare gjorda analyser. I studier av Lhotsky et al. (2017) och Pfiffner et al. (1997) användes 1000 mL vatten. I denna studie användes 7–40 mL vatten från varje grundvattenprov. Anledningen till att det användes en lägre vattenvolym var för att partiklar täppte igen filtret vilket gjorde att filtreringen fick avslutas när det inte rann vattnet igenom filtret. Om analysen skulle upprepas skulle en större vattenvolym användas. För att kunna öka vattenvolymen behöver partikelmängden reduceras, vilket kan göras genom att använda lägre pumphastighet vid provtagningen. Om det är svårt att filtrera med mikrobiellt filter (0,22 µm) skulle ett större filter behöva användas med den nackdelen att delar av biomassan kan rinna igenom vid filtrering.

En nackdel med att göra en undersökning ute i fält är markens heterogenitet, exempelvis att förhållandena i marken varierar med tid och plats. I försök som görs i kontrollerade förhållanden kan faktorerna varieras en och en för att undersöka den påverkande faktorn, vilket är svårt att genomföra vid en fältstudie. I en fältstudie får grundvattenrör med liknande förhållande användas. Att välja placering av brunnar är inte alltid möjligt då brunnarna kan vara borrhade före studien. I denna studie hade det varit optimalt att använda obehandlade brunnar som var placerade uppströms, men då befintliga grundvattenrör användes var det inte möjligt. Ett annat exempel på där anpassning till fältförhållandena fick göras var när ett grundvattenrör med högre toluenhalt än O<sub>2</sub> skulle användas, men fick ersättas med O<sub>2</sub> då rörets lock hade frusit fast. I flera studier som visar skillnader i bakterietillväxt och enzymaktivitet mellan behandlade och obehandlade områden har homogen jord från kontaminerade områden använts under kontrollerade förhållanden (Arienza, 2000; Li et al., 2015; Ringelberg et al., 2001). Det medför att effekten kan avgöras vid ett bestämt förhållande. Landmeyer and Bradley (2003) genomförde en studie på plats i marken som visar, liksom denna studie, att syrehalt och bakterier varierar mellan två platser efter behandling med ORC. För att få mer kunskap om hur ORC och miljöfaktorer som exempelvis toluen och syre påverkar bakterietillväxten och enzymaktiviteten föreslås att fler grundvattenrör samt lika många grundvattenrör från behandlade och obehandlade områden används.

Vidare studier behövs inom biostimulering med ORC. Det rekommenderas att studera hur enzymaktiviteten och bakterietillväxten påverkar föroreningshalten i grundvattnet under en längre tid, för att få större kunskap om hur föroreningshalten påverkas av bakterietillväxten och enzymaktiviteten vid saneringsåtgärden. I Sverige finns det många förorenade områden som behöver åtgärdas. Denna studie ger en ökad kunskap om vad som händer med bakterietillväxten och enzymaktiviteten vid användning av biostimulering med ORC. Kunskap för att i framtiden

kunna använda metoden ännu mer och effektivare så att antalet förorenade områden ska minska ytterligare. Sverige behöver öka engagemanget för reningsmetoder som görs på plats i marken. Exempelvis kan det göras genom att informera om vilka fördelar som finns med reningsmetoder på plats i marken, så den allmänna kunskapen om metoderna blir större. Ekonomiska styrmedel, som höjd deponiskatt, kan användas för att minska deponering av jordmassor som schaktats bort. Om åtgärdsmetoder som görs på plats i marken används i större utsträckning minskar behovet och användningen av de resurskrävande traditionella metoderna schaktning av jord och att pumpa upp grundvattnet för att sedan renas på annan plats. Användningen av biostimulering med ORC innebär att marken inte behöver grävas upp och det blir mindre ingrepp på platsen. Metoden medför att materialet kan bli orört i större skala, vilket leder till mindre spridning av föroreningarna i närliggande miljö samt att entreprenörers och närboendes exponering av den förorenade jorden och grundvatten minskar. Området behöver inte heller återfyllas med rena jordmassor, jordmassor som kan användas på ett bättre sätt.





## Slutsats

Denna studie kan inte påvisa att den utförda biostimuleringen med ORC i grundvattnet vid Bostiks verksamhetsområde och Helsingborgs hamn ökar bakterietillväxten och enzymaktiviteten i grundvattnet. En anledning kan vara heterogena miljöförhållanden i det undersökta området.

Flertalet av de studier som gjorts inom ämnet har varit under kontrollerade förhållanden. Erfarenheterna från denna studie kan vara till hjälp vid planering av nya fältstudier. För att få ytterligare kunskap om hur mikroorganismerna påverkas av ORC rekommenderas att fler studier görs på platser där efterbehandling med ORC genomförs. I undersökningarna föreslås att fler miljöfaktorer studeras för att utreda vad som inverkar på mikroorganismerna. En studie under en längre period rekommenderas eftersom grundvattentemperaturen varierar under året samt för att studera hur förändring i bakterietillväxt och enzymaktivitet vid ORC påverkar föroreningshalten i grundvattnet.



# Tack

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Per Bengtson för vägledning och stöd under hela examensarbetet. Vill även rikta ett stort tack till David Hagerberg på Tyréns som gav mig chansen att genomföra detta arbete samt vägledning och stöd under hela examensarbetet.

Vidare vill jag tacka Tyréns och Bostik för att jag fick göra studien där samt alla som hjälpt mig genomföra provtagning, analyser och svarat på frågor.

Lund, maj 2018

*Martina Strömberg*



# Referenser

- Arienzo, M., 2000. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in water and soil slurry utilizing a calcium peroxide compound. *Chemosphere*. 40: 331-337.
- Chapman, S., Byerley, B., Smyth, D. & Mackay, D., 1997. A pilot test of passive oxygen release for enhancement of in situ bioremediation of BTEX-contaminated ground water. *Ground Water Monit Remediat*. 17: 93-105.
- Eurofins., 2018. Analysrapport. Eurofins, Lidköping. 1 s.
- Gallizia, I., Vezzulli, L. & Fabiano, M., 2004. Oxygen supply for biostimulation of enzymatic activity in organic-rich marine ecosystems. *Soil Biol. Biochem*. 36: 1645-1652.
- Gleisner, M., 2017. Riktvärden för förorenad mark: [<http://www.naturvardsverket.se/Stod-i-miljoarbetet/Vagledning/Fororenade-omraden/Riktvarden-for-foro-renad-mark/>]. Tillgänglig: 2018-02-15.
- Green, C. & Scow, K., 2000. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeol J*. 8: 126-141.
- Hernandez, K. L., Yannicelli, B., Olsen, L. M., Dorador, C., Menschel, E. J., Molina, V., Remonsellez, F., Hengst, M. B. & Jeffrey, W. H., 2016. Microbial Activity Response to Solar Radiation across Contrasting Environmental Conditions in Salar de Huasco, Northern Chilean Altiplano. *Front Microbiol*. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01857.
- Kanisser, R. G. & Sims, G. K., 2011. Review article, Biostimulation for enhanced degradation of herbicides in soil. *Appl Environ Soil Sci*. DOI 10.1155/2011/843450.
- Kirchman, D. L., 2012. *Process in microbial ecology*. Oxford University press, Oxford. 312 s.
- Landmeyer, J. E. & Bradley, P. M., 2003. Effect of hydrologic and geochemical conditions on oxygen-enhanced bioremediation in a gasoline-contaminated aquifer. *Bioremediation J*. 7: 165-177.
- Lantmäteriet., 2018. Geodataportalen: [<https://http://www.geodata.se/GeodataExplorer/index.jsp?loc=sv>]. Tillgänglig: 2018-04-25.
- Lee, S., Lee, J., Koo, B., Kim, M., Choi, D. & Choi, I., 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1516-1522.
- Lhotsky, O., Krakorova, E., Linhartova, L., Kresinova, Z., Steinova, J., Dvorak, L., Roodsand, T., Filipova, A., Kroupova, K., Wimmerova, L., Kukacka, J. & Cajthaml, T., 2017. Assessment of biodegradation potential at a site

- contaminated by a mixture of BTEX, chlorinated pollutants and pharmaceuticals using passive sampling methods - Case study. *Sci Total Environ.* 407: 1451-1465.
- Li, H., Zhang, S.-Y., Wang, X.-L., Yang, J., Gu, J.-D., Zhu, R.-L., Wang, P., Lin, K.-F. & Liu, Y.-D., 2015. Aerobic biodegradation of trichloroethylene and phenol co-contaminants in groundwater by a bacterial community using hydrogen peroxide as the sole oxygen source. *Environ Technol.* 36: 667-674.
- Lindenbaum, J., 2017. Ritning kontrollprogram. Tyréns, Malmö. 1 s.
- Liu, S. J., Jiang, B., Huang, G. Q. & Li, X. G., 2006. Laboratory column study for remediation of MTBE- contaminated groundwater using a biological two-layer permeable barrier. *Water res.* 40: 4301-3408.
- Milic, J. S., Beskoski, V. P., Ilic, M. V., Ali, S. a. M., Gojgic-Cvijovic, G. D. & Vrvic, M. M., 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *J. Serb. Chem. Soc.* 74: 455-460.
- Nebe, J., Baldwin, B. R., Kassab, R. L., Nies, L. & Nakatsu, C. H., 2009. Quantification of aromatic oxygenase genes to evaluate enhanced bioremediation by oxygen releasing materials at a gasoline- contaminated site. *Environ Sci Technol.* 43: 2029-2034.
- Nilsson, P. 2017., De flesta förorenade områden är kända: [<http://www.naturvardsverket.se/Sa-mar-miljon/Mark/Forenaded-omraden/%5D>]. Tillgänglig: 2018-01-19.
- Padgett, M. C., Tick, G. R., Carroll, K. C. & Burke, W. R., 2017. Chemical structure influence on NAPL mixture nonideality evolution, rate-limited dissolution, and contaminant mass flux. *J. Contam. Hydrol.* 198: 11-23.
- Parreira, A. G., Totola, M. R., Jham, G. N., L, D. S. S. & Borges, A. C., 2011. Microbial biodegradation of aromatic compounds in a soil contaminated with gasohol. *Br Biotechnol J.* 1: 18-28.
- Pfiffner, S., Palumbo, A., Gibson, T., Ringelberg, D. & Mccarthy, J., 1997. Relating ground water and sediment chemistry to microbial characterization at a BTEX-contaminated site. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63: 775-788.
- Prevent., 2018. Toluen: [<http://www.prevent.se/kemiskaamnen>]. Tillgänglig: 2018-03-25.
- Regensis., 2007. Principles of chemical oxidation technology for remediation of groundwater and soil, RegenOX design and application manual. Regensis bioremediation products, San Clemente. 69 s.
- Regensis., 2017a. Bilaga 2A. In: Toft, J (ed.) *Tekniskt PM rörinstallation och injektering Fas 1, Insitu-sanering Bostik Helsingborg*. Tyréns, Helsingborg. s. 1-2
- Regensis., 2017b. Bilaga 2B. In: Toft, J (ed.) *Tekniskt PM rörinstallation och injektering Fas 1, Insitu-sanering Bostik Helsingborg*. Tyréns, Helsingborg. s. 1-3

- Regenesis., 2017c. Bilaga 2C. In: Toft, J (ed.) *Tekniskt PM rörinstallation och injektering Fas 1, Insitu-sanering Bostik Helsingborg*. Tyréns, Helsingborg. s. 1-4
- Regenesis., 2017d. Bilaga 2D. In: Toft, J (ed.) *Tekniskt PM rörinstallation och injektering Fas 1, Insitu-sanering Bostik Helsingborg*. Tyréns, Helsingborg. s. 1
- Regenesis., 2017e. Bilaga 2E. In: Toft, J (ed.) *Tekniskt PM rörinstallation och injektering Fas 1, Insitu-sanering Bostik Helsingborg*. Tyréns, Helsingborg. s. 1-3
- Regenesis., 2018. Advanced Oxygen Release Compound (ORC Advanced®): [<https://regenesis.com/en/remediation-products/orc-advanced/#1515101693679-7fd64c4a-1703>]. Tillgänglig: 2018-01-17.
- Richardson, S. D., Jones, M. D., Singleton, D. R. & Aitken, M. D., 2012. Long-term simulation of in situ biostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon- contaminated soil. *Bioremediation*. 23: 621- 633.
- Ringelberg, D. B., Talley, J. W., Perkins, E. J., Tucker, S. G., Luthy, R. G., Bouwer, E. J. & Fredrickson, H. L., 2001. Succession of phenotypic, genotypic and metabolic community characteristics during in vitro bioslyrry treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon- contaminated sediments. *Appl Envi Microbiol*. 67: 1542-1550.
- Scherer, M. M., Richter, S., Valentine, R. L. & Alvarez, P. J. J., 2010. Chemistry and Microbiology of Permeable Reactive Barriers for In Situ Groundwater Clean up. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 30: 363-411.
- Schäfer, D., Ebert, M., Köber, R., Plagentz, V. & Dahmke, A., 2006. Kinetic of oxygen release from ORC. *Bioremediation J*. 10: 71-82.
- SGF. 2013. Fälthandbok, Undersökningar av förorenade områden. Stockholm. 173 s.
- SGF-Åtgärdsportalen., 2015a. In situ: [<http://www.atgardsportalen.se/metoder/in-situ>]. Tillgänglig: 2018-01-19.
- SGF-Åtgärdsportalen., 2015b. Schaktsanering och behandling - Fördjupad beskrivning: [<http://www.atgardsportalen.se/metoder/ex-situ/grav-och-schaktsanering/gravoschakt-fordjupn>]. Tillgänglig: 2018-01-19.
- SGF-Åtgärdsportalen., 2017. Vattenreningsmetoder: [<http://www.atgardsportalen.se/metoder/vattenreningsmetoder>]. Tillgänglig: 2018-02-15.
- SGF-Åtgärdsportalen., 2018a. Air sparging- översikt: [<http://www.atgardsportalen.se/metoder/jord/in-situ/air-sparging>]. Tillgänglig: 2018-02-15.
- SGF-Åtgärdsportalen., 2018b. Ordlista: [<http://atgardsportalen.se/om-atgardsportalen/ordlista>]. Tillgänglig: 2018-03-15.
- SGU., 2013. Bedömningsgrunder grundvatten. 2013:01.Sveriges geologiska undersökning, Uppsala. 238 s.
- Shore, J., 2018. Regenesis, Bath, JShore@Regenesis.com. Privat kommunikation.

- Singleton, D. R., Jones, M. D., Richardson, S. D. & Aitken, M. D., 2013. Pyrosequence analyses of bacterial communities during simulated in situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon- contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 8381- 8391.
- Sinsabaugh, R. L., 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biol. Biochem.* 42: 319-404.
- Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., Ahmed, B., Allison, S. D., Crenshaw, C. L., Contosta, A. R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M. E., Gartner, T. B., Hobbie, S. E., Holland, K., Keeler, B. L., Powers, J. S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M., Wallenstein, M., Zak, D. R. & Zeglin, L. H., 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letter.* 11: 1252-1264.
- Sinsabaugh, R. L. & Linkins, A. E., 1988. Exoenzyme activity associated with lotic epilithon. *Freshw. Biol.* 20: 249-261.
- Smith, D. C. & Azam, F., 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using <sup>3</sup>H-leucine. *Mar. Microb. Food Webs.* 6: 107-114.
- Snajdr, J., Valaskova, V., Merhautova, V., Herinokova, J., Cajthaml, T. & Baldrian, P., 2008. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2068-2075.
- Toft, J., 2017. Tekniskt PM rörinstallation och injektering Fas 1, Insitu-sanering Bostik Helsingborg. Tyréns, Malmö. 8 s.
- Toxics, E. A., 2018. Toluene: [<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/toluene.pdf>]. Tillgänglig: 2018-02-12.
- Tyréns., 2016a. Anmälan om efterbehandling av förorenade områden. Tyréns, Helsingborg. 5 s.
- Tyréns., 2016b. PM efterbehandling av Bostik, Helsingborg. Tyréns, Lund. 5 s.
- Tyréns., 2017. PM komplettering anmälan om efterbehandling. Tyréns, Malmö. 8 s.
- Vezzulli, L., Pruzzo, C. & Fabiano, M., 2004. Response of the bacterial community to in situ bioremediation of organic-rich sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 740-751.
- Vinãs, M., Sabate, J., Espuny, M. J. & Solanas, M., 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote- contaminated soil. *Appl Environ Soil Sci.* 71: 7008-7018.
- Yeh, C.-H., Lin, C.-W. & Wu, C.-H., 2010. A permeable reactive barrier for the bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: Microbial community distribution and removal efficiencies. *J Hazard Mater.* 178: 74-80.



# Bilaga

**Tabell A.** Presenterar pH-värde och syrehalt (mg/L) i obehandlade grundvattenrör under september till mars. Där värden fattas gjordes ingen provtagning vid den aktuella tidpunkten. Provtagning genomfördes av Tyréns.

Provpunkt	Månad	pH-värde	Syrehalt (mg/L)
O1	September	6,3	
O1	Oktober	6,6	
O1	November	6,4	0,2
O1	December	6,4	0,3
O1	Januari	6,4	0,3
O1	Februari	6,3	0,5
O1	Mars	6,6	0,4
O2	September		
O2	Oktober		
O2	November	6,3	0,4
O2	December	6,3	0,8
O2	Januari	6,4	0,8
O2	Februari	6,3	0,6
O2	Mars		
O3	September		
O3	Oktober		
O3	November		
O3	December	6,4	0,8
O3	Januari	6,4	0,9
O3	Februari	6,3	1,5
O3	Mars	6,4	1,4

**Tabell B.** Presenterar pH-värde och syrehalt (mg/L) i behandlade grundvattenrör under september till mars. Där värden fattas gjordes ingen provtagning vid den aktuella tidpunkten. Provtagning genomfördes av Tyréns.

Provpunkt	Månad	pH-värde	Syrehalt (mg/L)
B1	September	6,3	
B1	Oktober	6,2	
B1	November	6,3	0,6
B1	December	6,3	0,6
B1	Januari	6,3	0,6
B1	Februari	6,3	2,5
B1	Mars	6,4	0,6
B2	September	8,6	
B2	Oktober	7,2	
B2	November	7,4	2,8
B2	December	8	1,9
B2	Januari	7	1,2
B2	Februari	7	1,2
B2	Mars	7	0,8
B3	September	9,2	0,2
B3	Oktober	8,9	
B3	November	8,8	0,3
B3	December	8	0,1
B3	Januari	6,9	0,3
B3	Februari	7,1	1
B3	Mars	6,9	0,2
B4	September	6,4	
B4	Oktober	6,2	
B4	November	6,1	0,2
B4	December		
B4	Januari	6,2	1,4
B4	Februari	6,2	0,4
B4	Mars	6,4	0,3



**LUNDS**  
UNIVERSITET

[WWW.CEC.LU.SE](http://WWW.CEC.LU.SE)  
[WWW.LU.SE](http://WWW.LU.SE)

Lunds universitet

Miljövetenskaplig utbildning  
Centrum för miljö- och  
klimatforskning  
Ekologihuset  
223 62 Lund