

UNDERSØKELSE AV MIKROORGANISMER ISOLERT FRA FANGDAMMER FOR VEIAVRENNING FRA E6

Mikrobiell nedbrytning av vaskemiddel (Remikraft 703) brukt til tunnelvask
og undersøkelse av dens effekter på bakterievekst

A STUDY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM DETENTION PONDS FOR HIGHWAY RUNOFF

Microbial degradation of detergent (Remikraft 703) found in runoff

Camilla Hedlund Corneliussen

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP
MASTEROPPGAVE 60 STP. 2007



Forord

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av Masterstudiet i økologi ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap. Arbeidet ble utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap. Hovedveileder har vært Jon Fredrik Hanssen ved IKBM og medveileder har vært Bjørn Olav Rosseland ved Institutt for Naturforvaltning. Oppgaven er knyttet opp til stipendiat Sondre Melands Ph.D. prosjekt Økotoksikologiske Miljøeffekter av Veivrenning ved UMB og Statens Vegvesen, hvor innhold og giftighet i fangdammene ved Vassum, Skullerud, Taraldrud og Smihagen (Akershus/Oslo) undersøkes i 2006-2009. Samtidig har det vært noe samarbeid med masterstudent Audhild Leistad ved UMB som har gjort undersøkelser av sedimentene i Vassum, Skullerud og Taraldrud under veiledning av Gunhild Riise.

Jeg vil rette en takk til Statens Vegvesen for økonomisk støtte av oppgaven, samt til Sondre Meland for råd og hjelp gjennom hele prosjektet. Takk også til Sven Roar Odenmarck ved Bioforsk for analyser og hjelp.

Tusen takk til Jon Fredrik Hanssen for god veiledning og mye tid, og til Bjørn Olav Rosseland for støtte og fotografier. Takk til Grethe Kobro og Else Marie Aasen ved IKBM for mye hjelp og veiledning under arbeidet på laboratoriet, og til Christer Fjeld og Katarina Gundsø Jensen for gode diskusjoner, råd og godt selskap på laben, lykke til videre med oppgaven, Katarina. En stor takk går også til Kristine Haugen for fine lunsjpauser med mye oppmuntring, lykke til med resten av oppgaven.

Til slutt en stor takk til mamma og pappa for masse hjelp og støtte på alle måter gjennom hele studietiden, og til Perri som har vært ekstremt tålmodig og snill.

Sammendrag

Det er store mengder forurensning som avsettes på veier og i tunneler, og som blir skyllet ned i grøfter, vann og jordsmonn hvor de kan ha alvorlige negative effekter. Denne avrenningen inneholder også ved tunnelvask store mengder vaskemidler som kan være svært giftig for vannlevende organismer. For å begrense skadene av slik avrenning er det ofte, spesielt i forbindelse med tunneler, opprettet fangdammer for avrenningsvann slik at det får en viss oppholdstid for lett nedbrytbare stoffer skal omdannes, og for at partikler med forurensning skal sedimentere og inaktiveres. En slik dam ligger ved Vassum, Ås i Akershus og mottar veiavrenning fra tre tunneler samt et stort areal veibane. I denne oppgaven er det gjort mikrobiologiske undersøkelser av dammen og med såpen Remikraft 703, i tillegg er det gjort undersøkelser i dammer ved Skullerud og Taraldrud (Oslo/Akershus).

Antallet dyrkbare bakterier i dammene ble bestemt til $\sim 10^6$ og 10^7 pr ml for hhv. vann og sediment, mens totaltallet var hhv. $\sim 10^7$ og 10^9 pr ml. En mindre andel av disse lot seg dyrke på medium tilsatt såpe (Remikraft 703) i renkulturer eller anrikningskulturer. Fem rene isolater ble identifisert til *Pseudomonas* slekt, fire av disse videre til to biotyper av *P. fluorescens*. Det viste seg at såpen i konsentrasjoner $< 1\%$ hadde liten effekt på vekst hos bakteriene, mens 1% økte lagfasen og generasjonstiden. Over 1% hadde såpen bakteriedrepende effekt. Akutt giftighet av såpen ble undersøkt hvor bakteriene ble utsatt for såpe i gitte konsentrasjoner og ved bestemt oppholdstid, og såpen viste bakteriedrepende effekt etter 5 min. ved $0,5\%$ løsning i vann for *P. fluorescens* biotype F mens uidentifisert *Pseudomonas* tålte opp til 30 min. eksponering.

Kulturene, både ren- og anrikning-, viste dårlig evne til å dyrkes på næringsfattig medium hvor såpen eller fenantren ville fungere som karbonkilde. Derimot viste de fleste kulturer god evne til å dyrkes på næringsfattig medium tilsatt olje eller diesel, og i flere, særlig anrikningskulturene så olje og diesel mengde ut til å være redusert. Forsøk med nedbrytning av alkoholetoksilatene i såpen over 14 dager viste at nedbrytning fant sted i samtlige kulturer, mest i anrikningskulturer, hvor det var $\sim 20-80\%$ og $\sim 80-100\%$ mindre AEO i prøvene med hhv. 1% og $0,25\%$ opprinnelig såpekonsentrasjon.

Abstract

Large amounts of pollution is deposited on highway and tunnel surfaces, and is flushed out to nearby ditches, aquifers and soil where it can have severely negative effects on the environment and its organisms. This runoff will also contain large amounts of soap used in tunnel flushing, which can be toxic to organisms in water recipients. There are several places, specially in connection to tunnels created ponds which receive this runoff. In these ponds, toxicity of the runoff is greatly reduced by sedimentation of pollution particles and degradation of easily degradable compounds. One of these ponds are situated near Vassum, Akershus, accepting runoff from three tunnels and a large area of road surface. In this theses, the microbiological community in this pond has been studied, as well as in two ponds at Skullerud and Taraldrud (Oslo/Akershus). Effects from the soap Remikraft 703 on microorganisms isolated from the ponds has also been studied.

The number of culturable bacteria in the ponds was $\sim 10^6$ and 10^7 pr ml for water and sediment samples respectively, and the total amount was $\sim 10^7$ and 10^9 pr ml respectively. Only a small amount was culturable in pure or enrichment cultures with soap-containing (Remikraft 703) media. Five pure isolates were identified as *Pseudomonas* genera, four of these as two different biotypes of *P. fluorescens*. The soap had little effect on bacterial growth at concentrations $< 1\%$, while 1% increased the lag phase and generation time. Higher concentrations than 1% instantly killed the bacteria. Acute toxicity for several concentrations of soap in water solution was tested at different exposure times. The study showed bactericide effects on *P. fluorescens* biotype F after 5 min. in a $0,5\%$ soap solution while the unidentified *Pseudomonas* culture could survive 30 min exposure.

Both pure and enrichment cultures showed poor abilities for growth on nutrient poor media when soap or phenanthrene was added as only carbon source. However, most cultures showed better growth when oil or diesel was added as the only carbon source. By analyzing the total the soap by its alcholethoxylate (AEO), biodegradation was shown for every tested culture after 14 days of culturing. The highest biodegradation rate was carried out by enrichment cultures, where a loss of total AEO were found to be $\sim 20-80\%$ and $\sim 80-100\%$ for cultures originally containing 1% and $0,25\%$ soap respectively.

Innhold

FORORD.....	1
SAMMENDRAG.....	3
ABSTRACT.....	5
1 INNLEDNING.....	11
1.1 Veiaavrenning.....	11
1.1.1 Komponenter i avrenningsvann fra veier og tunneler.....	11
1.1.2 Vaskestoffer.....	16
1.2 Fangdammer.....	21
1.3 Mikrobiologi.....	23
1.3.1 Biologisk nedbrytning.....	23
1.3.2 Identifisering av bakterier.....	25
1.4 Mål.....	30
2 MATERIALER OG METODER.....	31
2.1 Beskrivelse av fangdammene.....	31
2.1.1 Prøvetaking av vann og sediment.....	31
2.2 Isolering og dyrking av bakterier.....	34
2.2.1 Bestemmelse av antall dyrkbare og totalantall bakterier i vann og sediment.....	34
2.2.2 Isolering av bakteriekulturer dyrkbare på Remikraft 703.....	36
2.3 Identifisering av bakterier.....	38
2.3.1 Fenotypisk karakterisering.....	38
2.3.2 Molekylær karakterisering.....	39
2.4 Effekter av Remikraft 703 på bakterier.....	42
2.4.1 Vekst egenskaper.....	42
2.4.2 Toleranse for såpen ved ulike konsentrasjoner.....	44
2.4.3 Endringer i artssammensetning.....	45
2.4.4 Vekst på næringsfattig medium.....	48
2.4.5 Nedbrytning av komponenter i såpen.....	49
2.5 Dyrkning på forurensning.....	50
2.6 Gassprøver av sediment.....	50
3 RESULTATER.....	52

3.1 Isolering og dyrking av bakterier.....	52
3.1.1 Bestemmelse av antall dyrkbare og totalantall bakterier i vann og sediment.....	52
3.1.2 Isolering av bakteriekulturer dyrkbare på Remikraft 703.....	57
3.2 Identifisering av bakterier.....	59
3.2.1 Fenotypisk karakterisering.....	59
3.2.2 Molekylær karakterisering.....	61
3.3 Effekter av Remikraft 703 på bakterier.....	64
3.3.1 Vekst egenskaper.....	64
3.3.2 Toleranse for såpen ved ulike konsentrasjoner.....	67
3.3.3 Endringer i artssammensetning.....	68
3.3.4 Vekst på næringsfattig medium.....	70
3.3.5 Nedbrytning av komponenter i såpen.....	71
3.4 Dyrkning på forurensning.....	74
3.5 Gassprøver av sediment.....	76
4 DISKUSJON.....	77
4.1 Isolering og dyrking av bakterier.....	77
4.1.1 Bestemmelse av antall dyrkbare og totalantall bakterier i vann og sediment.....	77
4.1.2 Isolering av bakteriekulturer dyrkbare på Remikraft 703.....	79
4.2 Identifisering av bakterier.....	80
4.2.1 Fenotypisk karakterisering.....	80
4.2.2 Molekylær karakterisering.....	82
4.3 Effekter av Remikraft 703 på bakterier.....	82
4.3.1 Vekst egenskaper.....	82
4.3.2 Toleranse for såpen ved ulike konsentrasjoner.....	84
4.3.3 Endringer i artssammensetning.....	85
4.3.4 Vekst på næringsfattig medium.....	86
4.3.5 Nedbrytning av komponenter i såpen.....	87
4.4 Dyrkning på forurensning.....	88
4.5 Gassprøver av sediment.....	89
4.6 Sammendrag diskusjon.....	90
REFERANSER.....	92
APPENDIKS.....	95

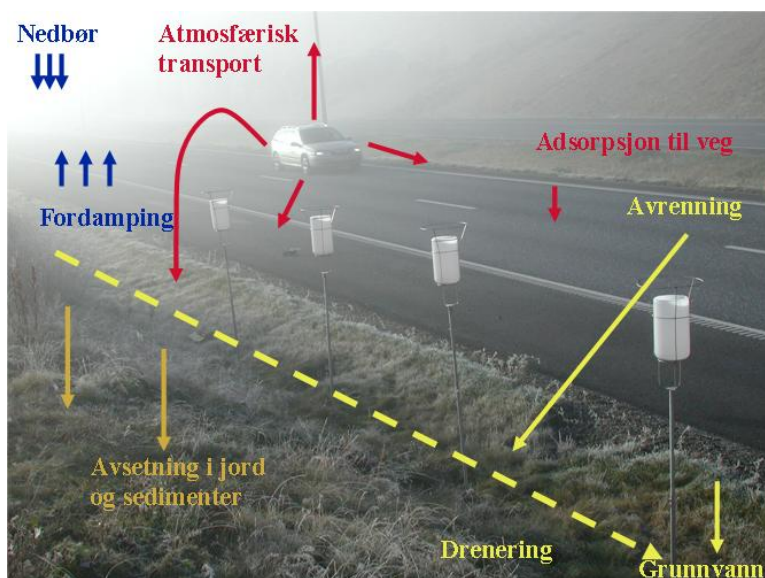
1. Innledning

Det er store mengder forurensning som avsettes på veier og i tunneler, og disse blir skyllet ned i grøfter, vann og jordsmonn hvor de kan ha alvorlige negative effekter. Ved tunnelvask brukes store mengder vaskemidler, som også vil befinne seg i avrenningsvannet til dammen og bidra til økt giftighet. For å begrense skadene av slik avrenning er det ofte, spesielt i forbindelse med tunneler, opprettet fangdammer for avrenningsvann slik at det får en viss oppholdstid for at lett nedbrytbare stoffer kan omdannes, og for at partikler med forurensning skal sedimentere og inaktiveres. Resipienten som mottar vannet fra fangdammen er dermed spart for mye forurensning, mens dammen akkumulerer store mengder, spesielt i sedimentene.

1.1 Veiaavrenning

1.1.1 Komponenter i avrenningsvann fra veier og tunneler

Komponentene knyttet til veier har ulike kilder og oppførsel, som vist i figur 1.1. Veiaavrenning er en blanding av forurensning bestående av en stor del tungmetaller, hydrokarboner, PAH (Polysykliske Aromatiske Hydrokarboner), surfaktanter og bitumen. Tabell 1.1 viser de viktigste stoffene og deres opprinnelse, mesteparten av innholdet i veiaavrenning korreleres til å være i direkte sammenheng med trafikkmengde, likevel er det vist at mindre enn 5 % av mange av stoffene kommer opprinnelig fra selve kjøretøyene,



Figur 1.1, viser kilder til avrenning og forurensning og hvor de transporteres. Kilde: Bioforsk/Statens Vegvesen.

dermed fungerer trafikken både som en mindre kilde og en transportvei for mange stoffer (Thomson et al. 1997). Konsentrasjonen av forurensningsstoffer i vaskevann fra tunneler er vesentlig høyere enn det man finner i overvann fra vei, og vannet kan gi akutte gifteffekter i følsomme resipienter (Roseth & Amundsen, 2006).

Tabell 1.1, Forurensningsstoffer knyttet til veier og tunnelvask (Roseth & Amundsen, 2006), (Patel 2005).

Kilde	Stoffer
Forbrenningsprodukter fra drivstoff	NO _x , tungmetaller (kadmium (Cd), krom (Cr), kobber (Cu), nikkel (Ni), bly (Pb) og sink (Zn)), hydrokarboner, polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), dioksiner, benzen, metyl-tert-butyl-eter (MTBE)
Slitasjeprodukter fra asfalt og bildekk	Tungmetaller (Cd, Cr, Cu, Ni, Zn), PAH, ftalater, partikler
Slitasje og korrosjon av materialer som bremsebelegg, katalysatorer, galvaniserte detaljer	Tungmetaller (Cu, Zn, Cd, platina Pt)
Salting	NaCl, cyanidforbindelser, Jern (Fe), Ni, Pb, Zn, Cr
Støvbindemiddel på grusveier	Kalsiumklorid, restprodukter fra tremasseindustri, bitumenmateriale
Sprenging, utgraving, veiarbeid, masseforflytning i anleggsperioder	Partikler, lekkasjer av bensin og olje, nitrat og ammonium, løste og partikulære stoffer
Sprøyting av veirabatter	Plantevernmidler, organiske stoffer
Søl av olje, bensin, diesel, spylevæske	Hydrokarboner, PAH, propylenglykol, tungmetaller (vanadium V, Ni)
Trafikkuhell	Olje, bensin, kjemikalier (farlig transport)
Tunnelvask	Overflateaktive stoffer
Dekk, bremses og motorslitasje	Zn, Cd, Fe, Cr, Cu og aluminium (Al)
Motorlekkasje og uforbrent drivstoff	Hydrokarboner

Små partikler har ofte høyere konsentrasjoner av forurensning enn større partikler, bl.a. pga de er ofte direkte produkter av kjøretøyaktivitet, de har relativt stor overflate:masse ratio og får derfor høyere adsorberingsrate enn større partikler, og de har lavere tetthet og inneholder en større andel organiske stoffer og visse leirmineraler som gjør at de lettere adsorberer f.eks. metaller (Deletic & Orr 2005). Tabell 1.2 viser at størstedelen av forurensningsstoffene fra tunnelvask er knyttet til partikler, samtidig vises variasjonen i konsentrasjoner mellom de ulike stoffene. Tungmetaller og PAH er høyst korrelert og assosiert med partikler i vegavrenning, og PAH adsorberer til sedimenter slik at filtrering og flokkuleringsprosesser effektivt kan fjerne disse (Herrmann 1981). Kolloid fraksjonen (< 0,45 µm) bidrar mer til

veiavrenning enn partikulær fraksjon ($> 0,45 \mu\text{m}$) i de fleste tilfeller/episoder og PAH er mest bundet til den kolloide fraksjonen (Aryal et al. 2006).

Tabell 1.2, maksimale og minimale konsentrasjoner av forurensningskomponenter i avrenning fra tunnelvask ved utvalgte tunneler i 1995, 1997 og (bl.a. Nordby- Smihagen- og Vassum tunnelene) i 2000-2003 (Roseth & Amundsen, 2006).

Parameter	Enhet	Løst fraksjon*		Totalinnhold**	
		Minimum	Maksimum	Minimum	Maksimum
Suspendert stoff	mg/l			823	3030
Løst organisk karbon	mg/l	12,6	84,5		596
Total fosfor	mg/l	0,001	8,68	0,376	8,4
Natrium	mg/l	7,37	1300	116	1220
Arsen	$\mu\text{g/l}$	i.d.	39	25	26
Kadmium	$\mu\text{g/l}$	i.d.	4,6	0,54	4,2
Krom	$\mu\text{g/l}$	i.d.	20	8,9	153
Kobber	$\mu\text{g/l}$	i.d.	85	22,7	681
Nikkel	$\mu\text{g/l}$	i.d.	24	11,3	140
Bly	$\mu\text{g/l}$	i.d.	16	4,1	171
Sink	$\mu\text{g/l}$	i.d.	7560	117	13800
PAH (total)	$\mu\text{g/l}$	0,04	201 $\square$	1,9	3,6

i.d.: under deteksjonsgrensen; *: innhold i filtrert avrenning; **: innhold i avrenning hvor partikler er inkludert; $\square$: uvanlig høyt innhold av løst PAH ble målt i avrenning fra Røldal-tunnelen i 1995.

1.1.1.1 Tungmetaller

Metaller kan bindes til partikler i avleiringer på og langs veiene, enten partikulær eller kolloid fraksjon. Pb og Fe er hovedsakelig ($> 90 \%$) forbundet med den partikulære fraksjonen, mens 24-55 % av Cu, Cr, Pb, Ni, Zn og Cd finnes i den kolloide fraksjonen, dvs. den løste fraksjonen i avleiringer (Deletic & Orr 2005; Harrison & Wilson 1985). Det er derimot observert at partikulær fase i avrenning etter nedbør inneholdt 90 % uorganisk Pb, 70 % Cu og 56 % Cd, og årsaken til at Pb også assosieres med finere partikler er at primærkilden har vært eksos (Deletic & Orr 2005).

1.1.1.2 Dioksiner

Polyklorerte dibenzo-p-dioksiner og dibenzofuraner kalles vanligvis dioksiner, og denne gruppen består av 75 ulike klorerte dioksiner og 135 ulike klorerte furaner, som alle har varierende giftige egenskaper. Alle forbrenningsprosesser der klor og karbon er til stede, er mulige dioksinkilder. Undersøkelser viser at dioksiner er lite biologisk nedbrytbare, men de kan til en viss grad brytes ned av sollys under gunstige forhold, i tillegg er de lite løselige i

vann og bindes heller til partikler og særlig organisk materiale (vanLoon & Duffy 2005). Dioksiner akkumulerer i organismers fettvev og oppkonsentreres dermed i næringskjeden. Eksponering for dioksiner kan blant annet føre til endringer i immunforsvaret, i forplantningsevnen og til utvikling av kreft (Statens Forurensningstilsyn 2006).

1.1.1.3 Løste stoffer, ioner og salter

Andre stoffer i veiavrenning er bl.a. SO_4^{2-} (sulfat), NO_3^- (nitrat), NH_4^+ (ammonium), fluorid og fosfat (ofte bundet til partikler). Mg^{2+} og K^+ finnes i stor grad forbundet med partikulært materiale, men konsentrasjonene er relativt lave i seg selv ($< 8 \text{ mg/L}^{-1}$) sammenlignet med Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- og SO_4^{2-} (Harrison & Wilson 1985). Den partikulære fraksjonen inneholder $< 1 \%$ (noen ganger opptil 3-4 %) av total Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- og SO_4^{2-} (Harrison & Wilson 1985). Hovedionene kommer fra atmosfærisk forurensning, og i perioder kan regn bidra med opptil 78 % av ioniske forurensninger og opptil 48 % av løste stoffer som forlater veioverflaten i avrenning, fosfor kommer derimot mest fra vegetasjon i nærheten av veien (Deletic & Orr 2005; Harrison & Wilson 1985).

Veisalter er ikke giftige i seg selv, men de kan ha en skadelig effekt på akvatisk liv, og kan inneholde en mengde andre mineraler og urenheter i tillegg til NaCl som er hoveddelen (Deletic & Orr 2005).

1.1.1.4 Petroleumsforbindelser

Raffinerte (behandlede) petroleumsforbindelser brukes mye i forbindelse med kjøretøy som motorolje og drivstoff, og i tillegg fraktes mye slike forbindelser i store mengder langs veiene. Stoffene består av lange hydrokarbonkjeder, spesielt alkaner, cycloalkaner og aromater, og jo lengre og mer forgrenet forbindelsene (karbonkjedene) er, desto lavere er nedbrytbarheten.

Alkaner har lignende struktur som fettsyrer og planteparafiner som finnes naturlig i miljøet, dermed er mange mikroorganismer i stand til å utnytte alkaner (rettkjdede) som eneste kilde til karbon og energi. Pga. dette er alkaner regnet som de mest nedbrytbare hydrokarbonene. Biodegradering av alkaner foregår med høyt BOD (biological oxygen demand) og danner til slutt en primær fettsyre som kan benyttes av cellene til syntese av membrankomponenter eller materialer for lipidlagring. Jo lengre karbonkjede alkanene har, desto lavere vannløselighet og biotilgjengelighet har de, derfor foretrekker ofte mikroorganismer alkaner med $\text{C}_{10} - \text{C}_{18}$. Alkaner med kortere karbonkjeder er giftige for cellene og kan derfor heller ikke brytes ned.

Alisykliske HK er en stor del av råolje (20-70 %) og finnes også i naturen som planteoljer, mikrobielle lipider og pesticider. Stoffene kan være både sykliske og sykliske med alkylgruppe, og det antas at biodegradering av disse stoffene foregår hovedsakelig ved kommensalistiske eller kometabolske reaksjoner.

Aromater består av en eller flere umettede ringstrukturer hvor benzen er den enkleste forbindelsen, og de som er satt sammen av to eller flere benzen ringer kalles Polysykliske Aromatiske Hydrokarboner (PAH). Aromatiske hydrokarboner finnes naturlig i miljøet, men utslippene har økt med bl.a. forbrenning av fossilt brensel. Noen av stoffene kan ha toksiske effekter på mikroorganismer, f.eks. er den vannløselige fraksjonen av raffinert olje mer giftig for heterotrofe mikroorganismer enn den vannløselige delen av råolje er, og kan hemme veksten til bakterier. En god del bakterier og sopp kan utføre delvis og komplett omdannelse av aromatiske forbindelser under flere miljøforhold. Generelt vil aromatiske forbindelser med en til tre ringer raskt omdannes og ofte fullstendig mineraliseres, mens forbindelser med fire eller flere ringer tar lengre tid å bryte ned da de er mindre biologisk tilgjengelige. Disse stoffene har også lavere vannløselighet og vil i større grad adsorbere til partikkeloverflater i jord og sediment og dermed ikke kunne brytes ned. Likevel er det observert at kronisk eksponering for aromatiske forbindelser vil føre til at populasjoner tilstede vil tilvenne seg stoffene og etter hvert være i stand til å bryte de ned. Aromatiske forbindelser kan også brytes ned anaerobt, dersom de inneholder oksygen, men disse reaksjonene foregår for det meste ved kometabolisme, og er avhengig av et mikrobielt samfunn med god diversitet. (Maier et al. 2000).

PAH dannes ved ufullstendig forbrenning av organisk materiale som eksos (fine partikler), eller de kommer fra asfalt og bildekk (grovere partikler) (Krein & Schorer 2000). Stoffgruppen har ulik grad av giftighet, og siden de er lite vannløselige kan de spres over store avstander i havstrømmer bundet til partikler og helst organisk materiale, og de avsettes i sedimenter. Fordi de bindes til organisk materiale vil de både kunne forbindes med vannfasen og med fast fase dersom en akvatisk resipient inneholder løst eller partikulært organisk materiale (vanLoon & Duffy 2005). PAH brytes ned i varierende grad og kan bioakkumuleres, små PAH forbindelser akkumulerer hurtigere enn store polysykliske (Krein & Schorer 2000; Statens Forurensningstilsyn 2006). PAH er også meget giftige for vannlevende organismer og kan påvirke reproduksjon hos bl.a. fisk (Statens Forurensningstilsyn 2006).

1.1.2 Vaskestoffer

I Norge utføres det jevnlig tunnelvask i alle sterkt trafikkerte tunneler, og pr 2006 brukes det flere typer såpe til tunnelvask: CW 613 Tunnelvask, Extra 217-2 Tunnelvask, Extra 613 Tunnelvask, Kraft Tunnelvask, Smart 50/Trust 50, Kraft Tunnelvask og Zalo ultra, i tillegg brukes WM Rens og Basol HK til skiltvask (Roseth & Søvik 2006). Veidrift AS er eneste aktør i Follo og Oslo området som vasker tunneler, og de bruker kun Remikraft 703 fra Remitek AS (Pers. medd. Frank Andersen 2006) som vist i tabell 1.3. Såpene har flere felles virkestoffer, men også mange ulike sammensetninger, og tabell 1.4 viser alle innholdsstoffer som er i bruk i Norge pr 2006 (Roseth & Søvik 2006). Stoffer som brukes i såper kan deles inn i såpestoffer, løsemidler, kompleksdannere, alkaliske stoffer og evt. fortykningsmidler (Roseth & Søvik 2006) og bruksområdene/klassifiseringen til noen av stoffene er oppgitt i tabellen.

Tabell 1.3, innhold av vaskestoffer i Remikraft 703 (Remitek AS) (HMS Datablad 2006).

Remikraft 703		
Stoffnavn, cas nr og	fareklasse	Kons. (vekt)
NTA-Natriumsalt, cas nr 5064-31-3	xn	1-5 %
Natriummetasilikat, cas nr 10213-79-3	C	1-5 %
Fettalkoholetoksilat, cas nr 68439-46-3	xi	1-5 %
Kvartær kokosalkylamin- etoksilat, cas nr 61791-10-4	xi, N	1-5 %

*Forklaring på fareklasser: C = etsende, N = miljøskadelig, xn = helseskadelig, xi = irriterende (øyne og/eller hud). * = ikke oppgitt.*

1.1.2.1 Tensider – løsemidler, overflateaktive stoffer (surfaktanter)

Tensider er en gruppe organiske, overflateaktive stoffer med en lipofil kjede og en hydrofil atomgruppe. De har lett for å bindes til sedimenter og til løste partikler som legger seg og danner sediment (Dyer et al. 2006). De fleste tensider er pga. deres overflateaktive egenskaper mer eller mindre giftige for organismer som lever i vann, og kan skade fisk, spesielt yngel, og andre vannorganismer i konsentrasjoner på 1-200 mg/l (Magnus 1996). For å være klassifisert som svanemerket må EC_{50} være > 1 mg/l, og i forhold til nye EU-regler skal primær nedbrytbarhet være ≥ 80 %. De aller fleste tensider blir biologisk nedbrutt i vann og jord, men graden av biologisk nedbrytbarhet er avhengig av molekylets form. Generelt vil økende hydrokarbonkjede (C12-15) føre til økende akvatisk giftighet, og for tensider med etoksileringer (EO kjeder) vil lengre EO-kjede (20-30EO) føre til saktere nedbrytning men lavere giftighet. (Magnus 1996).

Tabell 1.4, innhold og virkestoffer i såpene som benyttes til tunnel- og skiltvask i Norge pr. 2006 (HMS Datablad 2006; Roseth & Søvik 2006).

Stoff navn	Innhold i	Farekl./R-setn.	Stoffgruppe/bruksområde
Natriumkarbonat	CW 613, Basol HK	Xi, 36	Alkalier, karbonater
Kvartær kokosalkylaminetoksilat*	CW 613, Kraft, Extra 613, Extra 217-2, Remikraft 703	Xi, N*, 36	Kationisk tensid, løsemiddel
Etoksilert alkohol*	CW 613, Kraft, Extra 613, Smart 50, Basol HK, Remikraft 703	Xi, Xn, 22, 36, 38, 41	Ikke-ionisk tensid, løsemiddel
2(2-butoksyetoksy)etanol	CW 613, Kraft, Extra 613, Extra 217-2, Smart 50	Xi, 36	Løsemiddel
Natriumkaprylimminoetoksilat	CW 613,	Xi, 41	Amfotært tensid
Tetrakaliumpyrofosfat	Kraft, Extra 217-2		Kompleksbinder
Carbonic acid, dikaliumsalt	Extra 613	Xi	Kompleksbinder
Trinatriumnitilotriacetat (NTA)*	Extra 217-2, Remikraft 703	Xn, 22, 36	Chelat, kompleksbinder
1-oktyl-2-pyrrolidon	Extra 217-2	C, N, 34, 51/53	
Appelsinterpen/appelsinskalolje ^a	Extra 217-2, Smart 50	Xi, Xn ^a , 10 ^a , 65 ^a , 38, 51/53	Løsemiddel
Organisk modifisert polydimetylsiloksan emulsjon	Extra 217-2	Xi, 38, 41	
Alkyl dimetylaminoksyd	Zalo ultra	Xi, 38, 41	
Trietanolamin	WM-Rens	Xi, 36, 37, 38	Alkalier, aminer
Dinatriummetasilikat	Basol HK	C, 34-37	Alkalier, silikater
Natriumtripolyfosfat	Basol HK	IK	Kompleksbinder
Natriumnitritt	Basol HK	T, O, N, 8-25-50	
Natriummetasilikat	Remikraft 703	C	Alkalier, silikater
Tensid	Extra 217-2, WM-Rens	Xi ^b , Xn, N ^c , 22, 41, 51/53 ^c	Tensid
Amfotære tensider	Zalo	Xi	Amfotært tensid
Anioniske tensider	Zalo	Xi	Anionisk tensid

*: finnes i forskjellige former (cas-nr) hos de ulike såpene.

** : kun hos Remikraft 703.

^a: beskrevet hos Extra 217-2, stoffet har samme cas-nr. hos begge såpene men helt ulike fareklasser og R-setn. er oppført for de to.

^b: kun hos WM-Rens.

^c: kun hos Extra 217-2.

Forklaring på fareklasser og risikosestninger: C = etsende, Xn = helseskadelig, Xi = irriterende, IK = ikke klassifiseringspliktig, O = oksiderende, N = miljøskadelig, 10 = brannfarlig, 22 = farlig ved svelging, 25 = giftig ved svelging, 34 = etsende, 36 = irriterer øynene, 37 = irriterer luftveiene, 38 = irriterer huden, 41 = fare for alvorlig øyeskade, 51/53 = fare for vannlevende organismer, kan forårsake uønskede langtidsvirkninger i vannmiljøet, 50 = meget giftig for vannlevende organismer, 65 = farlig, kan forårsake lungeskade ved svelging.

Kationiske tensider

En type vaskestoff som brukes er gruppen av kationiske tensider kvartære ammoniumsforbindelser (QAC), bl.a. brukes kvartært kokosalkylaminetoksilat (synonymer: fettaminetoksilat, cocoalkylbis(2-hydroxethyl)ethoxylated methylammonium chloride) i Remikraft 703, mens det er fjernet i ny formulering av CW 613.

QAC har bakteriedrepende egenskaper, og mens den desinfiserende virkningen er størst ved høy pH, varierer den også mye mellom ulike typer av forbindelsene (Magnus 1996). QAC vil

ved lave konsentrasjoner (~1 mg/l) hemme formering av bakteriecellene (bakteriostatisk virkning) ved å binde seg til celleveggen på bakterien og ødelegge membranen, mens de ved høyere konsentrasjoner (200-400 mg/l) trenger stoffet inn i cellen og skader enzymer og nukleinsyrer slik at den dør (baktericid virkning) (Magnus 1996). Bruksløsninger av QAC kan være omtrent virkeløse ved 15-20°C, og gir tilfredsstillende effekt først ved 30-40°C (Magnus 1996). Såpen Remikraft 703 inneholder 1-5% QAC, noe som vil tilsvare ca 10-50 g/L og som dermed vil gi baktericid effekt ved riktig temperatur. Dersom løsningen med QAC også inneholder en chelatforbindelse, som i Remikraft 703 er til stede som NTA, vil Ca og Mg i cellemembranen til bakteriene bindes slik at QAC lettere kan trenge inn i cellen og drepe den, (Magnus 1996). Organiske stoffer, som også er tilstede i Remikraft 703, vil i motsetning til chelater hemme den antimikrobielle effekten noe, og dette vil også en del kationer som Fe, Al og Ca og anioniske tensider (Magnus 1996). QAC virker hemmende på de fleste mikrober og dreper mange vegetative bakterier, men pga. oppbyggingen av celleveggene virker stoffene ofte bedre på G⁺ enn på G⁻ bakterier (Magnus 1996). Enkelte bakterier utvikler resistens overfor vanlige bruksløsninger av QAC, da særlig *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. og *Proteus* spp., og stoffene dreper ikke tuberkelbakterier og sporer (Magnus 1996). Det er også isolert stammer av *Pseudomonas fluorescens* fra slam som kan vokse på og bryte ned noen typer QAC.

Det er kjent at lengden på alkylkjeden i QAC avgjør stoffets fysiske og kjemiske egenskaper i tillegg til å si noe om stoffets effekt på miljøet (Garcia et al. 2001), men QAC er generelt kjent for å ha samme påvirkning på miljøet som andre kationiske tensider, dvs. de adsorberes til sedimentpartikler i bunnslam og inaktiveres. QAC i vann er svært giftige og brytes langsomt ned, noe som kan forklares av den lave vannløseligheten og den høye giftigheten overfor mikroorganismer (Garcia et al. 2001; Roseth & Søvik 2006). Akutt toksisitet for QAC generelt er EC₅₀ alger 0,03-1,8 mg/l, EC₅₀ krepsdyr 0,1-7,7 mg/l og LC₅₀ fisk 0,3-7 mg/l (Roseth & Søvik 2006), mens for forbindelsen i Remikraft 703 er det betydelig lavere giftighet: EC₅₀ nitrifikasjonsbakterie 1800 mg/l/4t, EC₅₀ *Daphnia* 10-20 mg/l/48t og LC₅₀ fisk 10-30 mg/l/96t (HMS Datablad 2006). Primær nedbrytbarhet for fettaminetoksilatet i Remikraft 703 skal være > 90 %, mens biologisk nedbrytbarhet er < 60 % (HMS Datablad 2006).

Anioniske tensider

Anioniske tensider er svakt til middels alkaliske stoffer som dissosierer i et kation og et anion. Biologisk nedbrytbarhet er tilfredsstillende, dvs. $\geq 90\%$, miljøpåvirkningen er som beskrevet for tensider generelt, og stoffene er giftige for organismer som lever i vann: LC₅₀ fisk 1-20 mg/l/96t (meget giftig) og EC₅₀ *Daphnia* 5-250 mg/l/48t (giftig) (Magnus 1996). For noen anioniske tensider er det observert at mer enn 96 % fjernes i behandling (kloakk), hvorav 82 % er grunnet biologisk nedbrytning, og ca 16 % er adsorbering til slam (partikler og sedimenter), hvor de videre blir biodegradert til CO₂ (Stalmans et al. 1991).

Amfotære tensider

Denne stoffgruppen er vannløselig og dissosierer til anion eller kation avhengig av løsningens pH (lav pH = kation, høy pH = anion, nøytral pH = elektronnøytralt), og de er lett nedbrytbare (Magnus 1996). Amfotære tensider har tilsvarende egenskaper som QAC, men de har litt svakere antimikrobiell effekt og utvikler lettere resistente bakterier. Akvatisk toksisitet er ikke kjent, men miljøpåvirkningen og egenskaper for nedbrytning er som for andre tensider (Magnus 1996).

Et stoff som brukes i tunnelvask såper er Natriumkaprylimminoetoksilat, et amfotært tensid også kalt 2-etylhexylamindipropionat. Propionater brytes ned under både aerobe og anaerobe forhold og har relativt lav akutt toksisitet for alger, krepsdyr og fisk (Roseth & Søvik 2006).

Ikke-ioniske tensider

Disse stoffene består av en lipofil og en hydrofil del, og dissosierer ikke og danner ikke ioner i vann. De reagerer ikke med f.eks. tungmetall- eller kalsiumioner, men de kan øke vannløseligheten ved å hydratisere. Siden de er lite reaktive, er de mindre giftige enn andre tensider (Magnus 1996). Ikke-ioniske tensider er bl.a. alkoholetoksilater (AEO). Et stoff i Remikraft 703 er et fettalkoholetoksilat C9-11, dvs. det har kjeder med 9, 10 og 11 karbonatomer og varierende etoksilering (EO), og skal dermed ha lav giftighet i forhold til C og EO, LC₅₀ er 1-10 mg/l/96t for fisk, EC₅₀ 1-10 mg/l/48t for *Daphnia* og EC₅₀ 1-10 mg/l/72t for alger (HMS Datablad 2006). Etoksilerte fettalkoholer er tilfredsstillende nedbrytbare og forventes ikke å bioakkumulere og etoksilerte alkylfenoler har god primær nedbrytbarhet, mens alkylfenolene i seg selv er tungt nedbrytbare og giftige for fisk, og etoksilerte propylenoksidkjeder også er tungt nedbrytbare (Magnus 1996). Biologisk nedbrytbarhet for forbindelsen i Remikraft 703 er $> 60\%$, mens den primære nedbrytbarheten er $> 90\%$ (HMS

Datablad 2006). Forbindelsen brytes fullstendig ned i løpet av 28 døgn ved standardiserte nedbrytningstester og innholdet av organiske komponenter reduseres med 70 % i løpet av 5 døgn (Roseth & Søvik 2006).

1.1.2.2 Kompleksbindere

Trinatrium nitrilotriacetat (her kalt NTA) tilhører gruppen chelater som er organiske syrer. Stoffet er ikke forventet å være miljøskadelig eller bioakkumulerende, og giftighet er målt til EC50 3200-5600 mg/l/96t for *Pseudomonas fluorescens*, NOEC opptil 10.000 mg/l/16t for *Pseudomonas putida*, EC50 560-1000 mg/l/48t for *Daphnia magna* og LC50 100 mg/l/96t for fisk (HMS Datablad 2006; Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2003). Den biologiske nedbrytbarheten er målt til > 90 % (HMS Datablad 2006). Flere bakteriestammer isolert fra kloakk, jord og sediment er i stand til å vokse på NTA og mineraliserer stoffet fullstendig etter primær nedbrytning har funnet sted (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2003). Nedbrytningen kan hemmes av tilstedeværelse av kvikksølv (Hg), men dette er ikke generelt observert for noen andre metaller (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2003). Det er imidlertid observert at Cu og Ni danner stabile komplekser (metallchelater) med NTA og hindrer biodegradering hos *Chelatobacter heintzii*, og det samme for Co og Zn dersom det ikke er stoffer tilstede som kan konkurrere med NTA om metallbindingen (White & Knowles 2000). Mn, Mg og Ca danner ikke sterke nok metallkomplekser med NTA til å hemme nedbrytning hos *C. heintzii* (White & Knowles 2000).

1.1.2.3 Alkalier

De fleste alkalier bortsett fra aminer er uorganiske stoffer som i vann dissosierer til bl.a. et hydroksidion som gir en sterkt basisk reaksjon. Stoffene kan kun påvirke miljøet dersom den alkaliske virkningen er betydelig, men fosfater og ammoniakkløsninger forurenses også med næringsstoffer (fosfor og nitrogen) (Magnus 1996).

Karbonater

Disse stoffene er lett vannløselige og har i praksis liten miljøpåvirkning (Magnus 1996). Natriumkarbonat som brukes i noen tunnelvask såper er vurdert som lite miljøskadelig for akvatiske organismer: LC50 300-700 mg/l/96t for fisk og EC50 265-565 mg/l/48t for krepsdyr (Roseth & Søvik 2006). I vann vil natriumkarbonat dissosieres til natrium- og

karbonationer (Na^+ og CO_3^{2-}), hvor Na^+ vil adsorberes til partikler og sedimenter, og ikke bioakkumuleres, mens karbonationet vil danne HCO_3^- og OH^- . Miljøeffekter av natriumkarbonat er dermed bare forårsaket ved at OH^- gir en sterkt basisk vannløsning. (Chemicals 2003).

Silikater

Silikater er sterkt alkaliske, og miljøpåvirkning er som for karbonater, kun ved store utslipp får man økt pH nok til at vannorganismer kan ta skade (Magnus 1996). Natriummetasilikat ($\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), som brukes i Remikraft 703 vil dissosiere i vann til kation Na^+ og anion SiO_3^- . Giftigheten for dette stoffet er vurdert til $\text{LC}_{50} > 100 \text{ mg/l/96t}$ for fisk og $\text{EC}_{50} > 100 \text{ mg/l/100t}$ for *Daphnia* (HMS Datablad 2006).

Aminer

Tri-, di- og monoetanolamin er en gruppe organiske stoffer som dissosierer i vann og gir en basisk reaksjon. De er sterkt alkaliske og løselige i vann, og alle er biologisk nedbrytbare og påvirker kun vannorganismer i konsentrasjoner $> 200 \text{ mg/l}$ (Magnus 1996). Trietanolamin (WM-Rens) har lav toksisitet for fisk, *Daphnia* og alger og blir sluppet ut hovedsakelig i vann, hvor det kan brytes ned biologisk med en forventet halveringstid på 1-10 dager uten forventet bioakkumulering (MSDS 2006; Chemicals 2003).

1.2 Fangdammer

Veioverflater mottar og akkumulerer mange forurensningsstoffer fra kjøretøy. Kvantitativt er de fleste typer forurensning som nevnt mest knyttet til partikler, og mengde forurensning avhenger av bl.a. trafikk tetthet, salting, asfalttype, bruk av piggdekk og forurensning fra andre kilder enn trafikk (Aryal et al. 2006; Deletic & Orr 2005; Herrmann 1981). Ved f.eks. nedbørsepisoder og snøsmelt blir disse stoffene skylt vekk fra veiene og havner i nærliggende grøfter, vann og jord. I tunneler er det egne ledningsnett som samler vaskevannet, og for mange tunneler føres dette til utslipp i nærmeste vassdrag, hvor det i verste fall kan gi akutte gifteffekter på vannlevende organismer nedstrøms utslippsstedet (Roseth & Amundsen, 2006). Det er flere steder i den forbindelse opprettet konstruerte fangdammer som tar imot slik veiavrenning, og hvor partikler i vannet blir sedimentert og lett nedbrytbare forbindelser har en viss oppholdstid slik at de kan brytes ned før de slippes ut i akvatiske resipienter (Roseth & Amundsen, 2006). Siden hoveddelen av forurensningskomponentene i vaskevannet er knyttet til partikler, vil sedimentering av disse i en rensedam derfor bidra til en effektiv

fjerning av forurensningsstoffer og reduksjon av giftigheten i vannet (Roseth & Amundsen, 2006).

Ved Vassum i Akershus er det konstruert en slik dam, som i tillegg til å sedimentere partikler også er tilrettelagt biologisk nedbrytning av vaskemidler til tunnelvask og vil gi en teoretisk oppholdstid på 5 døgn (Roseth et al. 2002). I løpet av de første 15 månedene dammen var i bruk samlet det seg omtrent 5 tonn forurenset sediment i sedimentasjonsbassenget (Roseth & Amundsen, 2006). I løpet av ett år blir det vasket opp til seks ganger i hver av tunnelene Nordby, Vassum og Smihagen, hvor alt vaskevannet går til Vassum dammen. Det er store mengder vann og såpe som benyttes, og om lag 30-60 % av det totale vannforbruket havner i avrenningen, resten fordampes inne i tunnelen (Roseth & Amundsen, 2006). Under tunnelvask 20.-21. april 2006 ble det til sammen tilført 62.000 liter avrenningsvann til dammen (Meland et al. 2007). Faren for akutte forurensningseffekter under vaskeepisoder reduseres betydelig når avrenningsvannet går gjennom anlegget ved Vassum, og den totale belastningen i resipienten Årungsella reduseres (Snilsberg et al. 2002). Dette skjer ved sedimentering, slik at utløpsvannet fra dammen inneholder betydelig færre partikler enn innløpsvannet, og i tillegg en større andel partikler i mindre enn 0,5 µm (Snilsberg et al. 2002). Samtidig er det i størst grad Zn, PAH og noe Cu som fjernes i dammen, mens Na, Cl og S i liten grad påvirkes av sedimentasjonsprosessen (Snilsberg et al. 2002).

Forsøk gjort med fisk som ble satt ut i dammen og Årungsella viser en 100 % dødelighet etter 9 uker i dammen (Meland et al. 2007). I løpet av forsøksperioden ble det utført helvask av tunnelene og det var en del snøsmelt samt nedbør. Elva er også giftig både nedstrøms utløpet fra dammen og ved referanseområdet (Meland et al. 2007), at referanseområdet er mer giftig (ca 15 % dødelighet) enn elva et stykke nedenfor utløpet (ca 5 % dødelighet) kan forklares med at Årungen også er giftig. Tester med bunndyr fra Årungsella som ble satt ut i bassengene viste en umiddelbar dødelighet i sedimenteringskammeret etter tilføring av vaskevann, mens det i var overlevelse i 3-4 døgn i hovedbassenget (Roseth et al. 2002).

Bioforsk har også utført flere forsøk på giftigheten av avrenningsvannet til Vassum med Microtox akutt test og vist bl.a. at utløpsvannet ikke er giftig for mikroorganismer, mens innløpsprøven til har en EC50 = 0,6 % (Snilsberg et al. 2002). Tester gjort på vaskevann er imidlertid blitt utført med andre såper enn den som benyttes i dag og som blir brukt til forsøk i denne oppgaven (Remikraft 703). Denne finnes det ikke litteratur på i forhold til forsøk på giftighet og nedbrytbarhet annet enn HMS Datablad fra Remitek AS, hvor såpen og dens

innhold er klassifisert som biologisk nedbrytbar og ikke vurdert miljøskadelig, beregnet LD50 (rotte) > 2000 mg/kg (HMS Datablad 2006).

1.3 Mikrobiologi

1.3.1 Biologisk nedbrytning

1.3.1.1 Aerob nedbrytning

Biologisk nedbrytning eller biodegradering er nedbrytning av organiske forurensninger gjennom mikrobiell aktivitet basert på at mikroorganismer, f.eks. bakterier kan utnytte flere stoffer som kilder for energi og karbon. Stoffet må først være i en biotilgjengelig (vannløselig) form, slik at bakteriene kan ta de opp i cellene, deretter må de rette enzymene være tilstede i cellen for å katalysere trinnene i nedbrytningen. Noen enzymer virker også utenfor cellene og bryter ned makromolekyler. Degradering er ikke mulig dersom ikke alle enzymene er til stede og tilgjengelige. Persistente organiske stoffer er ofte et resultat av ukjente og kompliserte kjemiske strukturer som enzymer ikke kan gjenkjenne eller at de rette enzymene ikke er tilstede, noe som også kan føre til ufullstendig nedbrytning av stoffet. Dette kan i noen tilfeller føre til polymerisering eller syntese av forbindelser som er mer komplekse og stabile enn de opprinnelige, i andre tilfeller vil et stoff kunne delvis oksideres men energien som dannes kan ikke benyttes til mikrobiell vekst, noe som kalles kometabolisme. Primær nedbrytning er den første endringen i strukturen til molekylet som brytes ned, og fører til at fysiske og kjemiske egenskaper endres. Forurensningene går etter dette ofte gjennom en fullstendig biodegradering eller mineralisering bestående av en rekke trinn som involverer oksidasjon av det opprinnelige stoffet for å danne CO₂ og H₂O slik at både karbon og energi er tilgjengelig for cellenes vekst og reproduksjon. (Maier et al. 2000)

Når en forurensning slippes ut i miljøet vil nedbrytningen være avhengig av egenskapene til mikroorganismene i nærheten. Tiden det tar før de er akklimatisert til forurensningen og kan bryte den ned avhenger av tidligere eksponering, men også av evnen de har til å tilpasse seg via mutasjoner eller genoverføringer slik at de kan syntetisere de nødvendige enzymene. En annen faktor som har innvirkning på nedbrytning av forurensninger er deres biotilgjengelighet. Desto mer vannløselig et stoff er jo lettere vil mikroorganismer komme i kontakt med det og kunne ta det opp, og stoffer som er mindre vannløselige eller adsorberes

til jord og sedimenter vil ofte brytes ned saktere eller ikke i hele tatt. Vannløselighet er viktigere for stoffer i fast fase enn i flytende form. Dersom en forbindelse adsorberes med svake bindinger til jord eller sedimenter, vil det først kunne brytes ned når bindingen reverseres og stoffet igjen befinner seg i løsning tilgjengelig for mikroorganismene. (Maier et al. 2000)

Når både enzymene og biotilgjengeligheten er tilfredsstillende er det fremdeles andre faktorer som kan spille inn på nedbrytningsraten til en forurensning, som dens struktur og toksisitet. Selv om en forurensning ligner en naturlig forekommende forbindelse kan forgreninger og funksjonelle grupper hindre enzymene å komme i kontakt med stoffet, og funksjonelle grupper som senker elektrontettheten hos forbindelsen der hvor det reagerer med enzymene vil bidra til lavere nedbrytningsrater. Toksisiteten til en forurensning kan drepe mikroorganismene som tar de opp, eller de kan hemme nedbrytningen ved å forstyrre cellemembranen deres. For hydrokarboner er det sammenheng mellom økt vannløselighet og økt toksisitet, men også andre egenskaper kan ha innvirkning på toksisiteten. (Maier et al. 2000)

I tillegg til egenskaper hos forurensningen er det også andre faktorer som må være til stede for at mikroorganismer skal kunne bryte den ned og også for at de selv skal kunne vokse. Oksygen, nitrogen, fosfor og organisk materiale må være tilgjengelig, og i tillegg må riktig temperatur, pH, salinitet (i vann/sediment) og vannaktivitet (i jord) være tilstede. Årsaken til at organisk materiale har innvirkning på nedbrytning er fordelingen i jord- eller sedimentlag. Øverst, hvor man finner mye organisk materiale og oksygen er det også høyere antall mikroorganismer, mens det i lagene med mindre organisk materiale ofte er færre celler, i tillegg til at de som befinner seg der gjerne er i uvirksom tilstand og dermed reagerer langsommere på forurensning og bruker lengre tid på å bygge opp en god nok populasjon til å bryte ned forurensningen. (Maier et al. 2000)

1.3.1.2 Anaerob nedbrytning

Noen steder i miljøet er det totalt mangel på oksygen, og organiske stoffer nedbrytes ved fermentering eller anaerob respirasjon, det siste via alternative elektronakseptorer. Disse alternativene kan være nitrat, mangan, jern, sulfat og karbonat. Ofte vil nedbrytningen av organiske stoffer anaerobt foregå via flere grupper mikroorganismer som hver utfører en

spesialisert reaksjon, og til slutt vil disse utgjøre komplett mineralisering til enten CO₂ eller CH₄. Det siste trinnet i anaerob nedbrytning er metanogenese, som foregår når andre uorganiske elektronakseptorer er oppbrukt, metan er dermed en indikator på anaerobe, nitrat- og svovelfattige forhold, og det forbindes ofte med bl.a. petroleumdeponier. Karbohydrater omdannes til omtrent like mengder CO₂ og CH₄, mens mer reduserte forbindelser produserer mer CH₄. (Maier et al. 2000).

1.3.2 Identifisering av bakterier

Definisjonen på en bakterieart: "Samling av stammer som har mange stabile egenskaper felles og som skiller seg betydelig fra andre stammegrupper."

Definisjonen på en bakteriestamme: "En populasjon av organismer som stammer fra en enkelt organisme eller fra isolat av renkultur og som er annerledes enn andre populasjoner innen samme taksonomiske kategori." (Prescott et al. 2005)

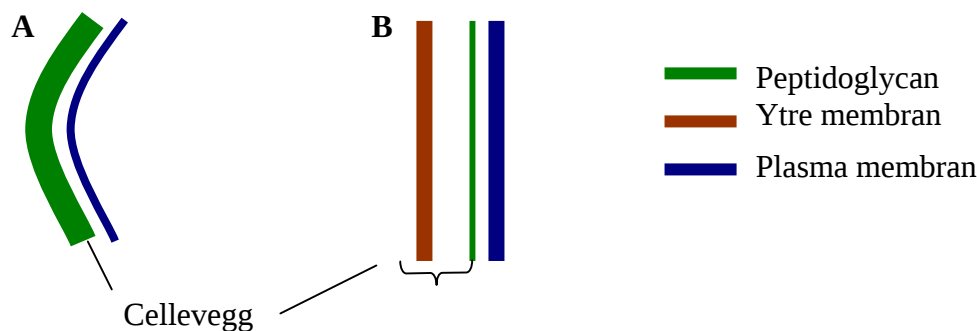
For å identifisere en isolert bakteriestamme til art kan ulike metoder benyttes, det ene er de klassiske med bl.a. fenotypisk karakterisering som morfologi og fysiologiske krav til miljøet, biokjemisk karakterisering som f.eks. hvilke enzymer cellene har, og karakterisering gjennom krav til næring som karbonkilder, energikilder og evnen de har til å utnytte ulike typer næringsstoffer. En annen måte å identifisere bakterier er gjennom molekylære metoder hvor man isolerer DNA fra cellen, oppformer utvalgte fragmenter av DNA molekylet og igjen valgte sekvenser av disse, og sammenligner med samme sekvens for identifiserte, kjente bakteriearter i en database. I kapitlene som følger er en kort oversikt over noen av de ulike metodene for karakterisering og identifisering av bakterier som er brukt i denne oppaven.

1.3.2.1 Klassiske tester

Gramfarging

Bakterier kan deles i to grupper basert på bestanddeler i celleveggen som vist i figur 1.2. Gram positive cellevegger består oftest av flere lag peptidoglycan som danner en tykk struktur i veggens i tillegg til plasmamembranen. Gram negative cellevegger derimot består kun av et eller noen få lag peptidoglycan men har en ytre cellemembran i tillegg til plasmamembranen. Fordi de inneholder så lite peptidoglycan er de mer mottagelige for mekanisk nedbrytning, men den ytre membranen beskytter mot lysing av cellen, og den

danner også en barriere mot f.eks. noen antibiotika (som penicillin), fordøyelsesenzymer, vaskestoffer og tungmetaller. Noen bakteriestammer kan bli gram-variable, ofte i eldre kulturer, hvor de begynner som gram positive men blir gram negative etter en stund. (Tortora et al. 2004). Gram farging ble først utviklet i 1884 av Hans Christian Gram for å skille mellom *Pneumococci* og *Klebsiella pneumoniae*.



Figur 1.2, viser oppbygging av **A**, gram positiv og **B** gram negativ cellevegg (Prescott et al. 2005).

Oksidase/katalase test

Oksidase test baserer seg på enzym/cytokrom komplekser i elektrontransportkjeden som fungerer som elektronbærere. En type cytokrom er cytokrom c oksidase, som reduserer O_2 og kunstige elektronakseptorer, og testen skiller mellom grupper av bakterieslekter basert på aktiviteten til cytokrom oksidase. Testen kan utføres bl.a. ved å benytte teststriper bestående av et lag med en fargeløs blanding av N,N-dimetyl-1,4-fenylendiammonium diklorid og 1-naftol. Når cytokrom oksidase oksiderer den kjemiske blandingen produseres indofenol blå og stripene blir blå/fiolett-farget. (Prescott et al. 2005).

Katalase: O_2 i celler danner toksiske stoffer som bl.a. H_2O_2 og O_2^- , og for å overleve må aerobe og fakultativt aerobe bakterier kunne kvitte seg med disse. Noen har enzymet superoksid dismutase og enten katalase eller peroksidase. De to siste enzymene katalyserer omdannelsen av H_2O_2 til O_2 og H_2O . Om en bakteriestamme har enzymet katalase eller ikke kan enkelt undersøkes ved å utsette kulturen for H_2O_2 , da katalase vil produsere O_2 i form av bobler. (Prescott et al. 2005).

BIOLOG Test System

BIOLOG mikroplater benyttes for å teste bakterienes evne til å nyttiggjøre ulike karbonkilder og kan identifisere dem fra deres "metabolic fingerprint". BIOLOG er mest effektiv for identifisering av gram negative bakterier, men det er én type plate for gram positive bakterier (GP2) og én plate for gram negative (GN2). Hver plate består av 96 brønner med til sammen 95 karbonsubstrater og 1 kontrollbrønn med vann (GN2 vist i appendiks). I tillegg er alle brønnene tilsatt 2,3,5-trifenyl tetrazolium klorid (TCC), som reduseres til tetrazolium-violett av elektronene i bakterienes elektrontransportkjede når bakteriene kan nyttiggjøre seg karbonkilden i brønnen. Mengden farge angir dermed grad av vekst på karbonkilden, og måles som økning i absorpsjon ved 590 nm i en plateleser etter 1-2 døgn. Resultatene registreres i BIOLOGs database og mønsteret for vekst i de ulike brønnene sammenlignes med mønster for kjente bakteriestammer (metabolic fingerprint). Problemet med å bruke denne metoden i miljøsammenheng er at databasen er laget for medisinsk bruk, dermed er det mange bakteriestammer fra jord og vann som ikke er registrert, og sannsynligheten for å identifisere disse er mindre. Databasen inneholder rundt 25 % av alle identifiserte arter. I tillegg er metoden laget hovedsakelig for bakterier som er hurtigvoksende, mens bakterier fra miljøet ofte vokser langsommere. (Garland & Mills 1991; Konopka et al. 1998).

1.3.2.2 Molekylære metoder

DNA isolering

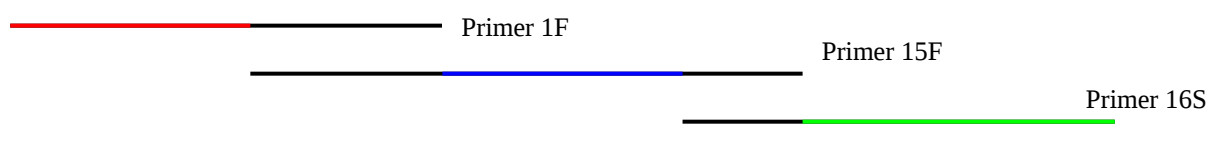
Det er utviklet mange metoder for å isolere DNA fra bakterieceller, noen går ut på en omfattende prosedyre med fenol-kloroform ekstrahering, andre er raskere prosedyrer med f.eks. CTAB, eller ferdige kit. Felles for metodene er at celleveggene lyses (f.eks. enzymatisk med lysozymbehandling) slik at DNA frigjøres fra cellene, og ved å tilsette RNaser (som f.eks. Proteinase K) fjernes RNA, og ved å tilsette en fenol/kloroform blanding denatureres proteinene mens DNA beholdes. Ved sentrifugering skilles DNA fra resten og dette blir deretter vasket, ofte med etanol. Så blir DNA løst i en buffer (f.eks. AE) og kan oppbevares kjølig over korte perioder eller fryst over lengre perioder. Kit kan ofte fungere dårlig på celler som er vanskelige å lysere, og dermed må mer omfattende metoder benyttes, som f.eks. CTAB eller kit hvor man bruker silika-kuler eller lignende for å ødelegge cellene.

PCR (Polymerase Chain-Reaction)

Polymerase kjedereaksjon syntetiserer store mengder av et DNA fragment ved hjelp av primere (spesifikke oligonukleotide sekvenser) og er basert på DNA replikasjonen som skjer naturlig i cellene. I PCR maskinen blir prøvene varmet opp til 93-98°C slik at dobbelttrådet DNA denatureres og danner enkelttrådet DNA. Deretter senkes temperaturen til mellom 40 og 60°C slik at oligonukleotide primere som er komplementære til sekvensområdet man er interessert i, kan binde seg til DNA-templatet og fungere som bindepunkt for DNA-polymerasen. Temperaturen heves deretter til 72°C slik at DNA syntesen starter, og DNA polymerasen forlenger DNA tråden ved hjelp av frie nukleotidbaser (dATP, dTTP, dCTP og dGTP). Slik får man produsert en ny DNA tråd som igjen kan brukes som templat for å produsere nye DNA tråder. Denaturering, primerbinding og forlenging av DNA templat gjentas derfor 20-35 ganger i en PCR reaksjon slik at man får dannet mange kopier av samme DNA tråd. (Prescott et al. 2005).

Sekvensering

Sekvensering baserer seg på dideoksynukleotidtermineringsmetoden, hvor man tilsetter dideoksynukleosid trifosfat byggestener (dATP, dGTP, dTTP og dCTP) og DNA polymeraser for DNA syntese. I tillegg tilsettes fire dideoksynukleosid trifosfater (ddATP, ddCTP, ddGTP og ddTTP) som mangler 3'OH grupper for videre DNA syntese. Alle dideoksynukleosidene har fått hvert sitt fargestoff (ddTTP=rød, ddATP=grønn, ddCTP=blå, ddGTP=sort) som fluoriserer ved en bestemt bølgelengde og gjør det mulig å skille de. Det brukes tre primere (f.eks. 1F, 15F og 16F) for å oppforme tre sekvenser av DNA fragmentene hvor to og to sekvenser overlapper en bit, slik at de kan settes sammen til en lengre sekvens, som i figur 1.3. En blanding bestående av vanlige dideoksynukleosider og terminale dideoxynukleosider med fluoriserende fargestoffer fører til at det blir produsert DNA sekvenser av ulike lengder slik at man ved kapillær gelelektroforese kan analysere resultatet av sekvenseringen og bestemme baserekkefølgen i DNA sekvensen. Signalene vil overføres til en datamaskin og sekvensene gis som kurver og bokstaver (A, T, C og G).



Figur 1.3, tre ulike sekvenser laget fra tre primere settes sammen til en lengre sekvens (nederst) hvor overlappene er fjernet.

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool er en database hvor man kan sammenligne egne resultater med kjente sekvenser ved å søke gjennom bl.a. kjente proteinsekvenser, nukleotidsekvenser eller genomer. BLAST gir bl.a. statistiske resultater på likheten og informasjon om den kjente sekvensen og dens opphav. BLAST er tilgjengelig via hjemmesiden <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> fra the National Center for Biotechnology Informasjon (NCBI).

Denaturant Gradient Gel Elektroforese (DGGE)

DGGE ble utviklet for å finne punktmutasjoner i genetiske forsøk, men ble introdusert til mikrobiell økologi av Muyzer et. al (1993). Metoden baserer seg på å skille mellom DNA molekyler med forskjellig basepar-sekvenser uavhengig av sekvensstørrelse slik at man kan sammenligne flere prøver for deres mikrobielle diversitet (Muyzer et al. 1993). Separasjon i DGGE er basert på smeltemener (fragmenter med basepar med identisk smeltetemperatur), og i en DGGE vil temperaturen holdes konstant slik at smelting av domener varierer i forhold til konsentrasjonen av denaturanten urea/formamid (Muyzer et al. 1993). Når denne konsentrasjonen er nådd for hver sekvens vil DNA delvis smelte (denaturere) og forgrenes, og dermed vil mobiliteten til DNA i gelen synke (Muyzer et al. 1993). Dette stedet tilsvarer da en gitt posisjon i DGGE gelen for hver sekvens. PCR kan brukes for å selekere for sekvensen man ønsker å finne ved at man tilsetter en GC-rik sekvens til DNA molekylet før DGGE. På denne måten vil man modifisere denatureringen til fragmentet man ønsker å undersøke til den grad at man kan detektere opptil 100 % av alle mulige sekvensvariasjoner (Muyzer et al. 1993).

1.4 Mål

I denne oppgaven undersøker jeg det mikrobielle samfunnet hovedsakelig i dammen ved Vassum (Akershus), men også noe i Taraldrud (Akershus) og Skullerud (Oslo). Oppgaven vil gi en kvantitativ oversikt over antall bakterier, og kartlegge noen av deres egenskaper i forhold til forurensningsstoffene i vannet, særlig såpen som brukes til tunnelvask, Remikraft 703. Det er ikke tidligere gjort forsøk med denne spesifikke såpen som blir brukt i området, og derfor blir dens effekter på og giftighet ovenfor mikroorganismer i dammen studert. Det er et krav til såper som brukes i tunnelvask at de skal være miljøvennlige og oppfylle krav om biologisk nedbrytbarhet, og jeg ønsket derfor å teste dette.

Hovedmålene for denne masteroppgaven var å

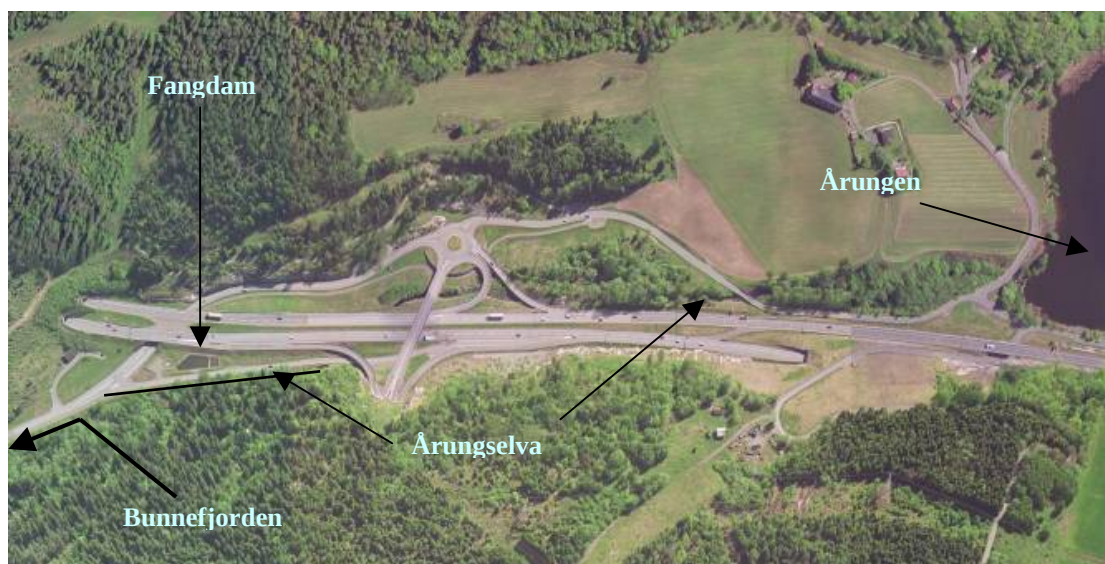
- Få en oversikt over antall bakterier i dammen og sammenligne antallet i sedimenteringskammeret og hovedbassenget, vann og sedimenter og før/etter tunnelvask og andre episoder.
- Isolere bakteriekulturer fra dammene som er dyrkbare på Remikraft 703 i ulike konsentrasjoner og teste de i forhold til
 - effekter av såpen
 - nedbrytning av komponenter i såpen
 - egenskaper i forhold til andre forurensninger som finnes i veiavrenning

2. Materialer og metoder

Næringsmedier og løsninger er beskrevet i appendiks.

2.1 Beskrivelse av fangdammene

Fangdammen for oppsamling av veiavrenning ved Vassum ligger som vist i figur 2.1 nedenfor sørgående felt på E6 sør for Nordby tunnelen i Ås, Akershus, og utløpsvannet slippes ut i Årungselsva som kommer fra Årungen og går ut i Bunnefjorden i Oslofjorden. Dammen ved Taraldrud ligger nedenfor sørgående felt på E6 ved Taraldrud, mens den ved Skullerud ligger under E6 i Skulleruddumpa i Oslo. Vassum dammen er et vått overvannsbasseng vist i figur 2.2, og består av et støpt sedimenteringskammer med overflateareal 50 m² og et hovedbasseng på 500 m² (Snilsberg et al. 2002).



Figur 2.1, viser beliggenheten til dammen ved Vassum. Foto: Statens Vegvesen.

2.1.1 Prøvetaking av vann og sediment

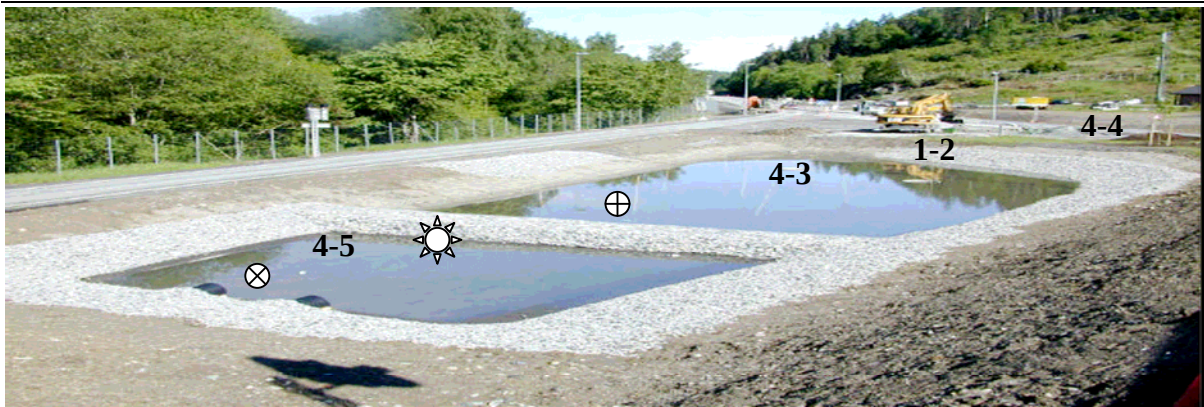
Det ble til sammen tatt 16 prøver av vann og sediment fra Vassum i perioden 18.04.06 til 21.09.06, og én vannprøve fra hver av dammene Skullerud og Taraldrud 21.09.06, som til sammen utgjør fire sett med prøver (prøve 1-4). Figur 2.2 viser prøvetaking i Vassum 21.09.06. Tabell 2.1 viser når og hvor prøver ble tatt, og hvordan de er navngitt/nummerert videre, og figur 2.3 viser hvor i dammene prøvene er tatt.



Figur 2.2, prøvetaking i Vassum 21.09.06, sedimenteringskammer (venstre) og hovedbasseng (høyre).
Foto: C. H. Corneliussen.

Tabell 2.1, viser alle prøvene som ble tatt og videre nummerering av disse.

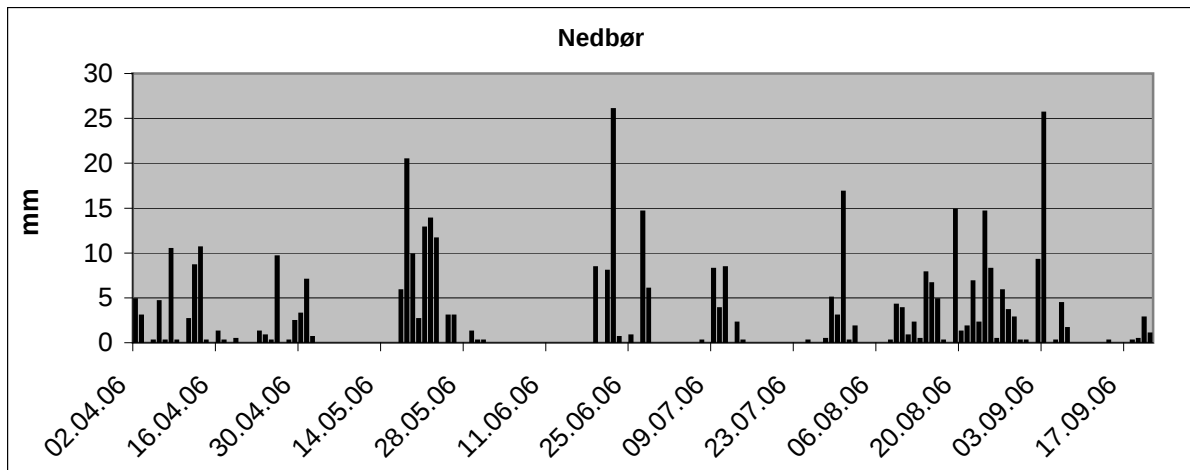
Prøve nr	Dato	Opprinnelse	Type
1-1	18.04.06	Sedimenteringskammer	Vann
1-2	18.04.06	Hovedbasseng	Vann
1-3	18.04.06	Sedimenteringskammer	Sediment
2-1	28.04.06	Sedimenteringskammer	Vann
2-2	28.04.06	Hovedbasseng	Vann
3-1	19.05.06	Sedimenteringskammer	Vann
3-2	19.05.06	Hovedbasseng	Vann
3-3	19.05.06	Sed. kammer ved innløp	Sediment
3-4	19.05.06	Sed. kammer ved barriere	Sediment
3-5	19.05.06	Hovedbasseng	Sediment
4-1	21.09.06	Sed. kammer ved innløp	Vann
4-2	21.09.06	Sed. kammer ved barriere	Vann
4-3	21.09.06	Hovedbasseng	Vann
4-4	21.09.06	Oppsamlingskum	Vann
4-5	21.09.06	Sed. kammer midt i	Sediment
4-6	21.09.06	Sed. kammer ved utløp	Sediment
4-7	21.09.06	Skullerud	Vann
4-8	21.09.06	Taraldrud	Vann



☀ = 1-1, 2-1, 3-1, 3-4 og 4-2 ⊗ = 1-3, 3-3, 4-1 og 4-6 ⊕ = 2-2, 3-2, 3-5

Figur 2.3, viser de tre dammene som er med i forsøkene. Stedene hvor prøver er hentet er merket med prøvenavn. Øverst: oversikt over dammen ved Vassum og prøver i denne. 4-4 angir oppsamlingskummen utenfor dammen. Nede, venstre: viser dammen ved Skullerud, sett fra utløpet og utover. Nede, høyre: dammen ved Taraldrud sett fra utløpet. Foto: R. Roseth (Bioforsk), C. H. Corneliussen og B. O. Rosseland.

Figur 2.4 viser målt nedbør ved Ås målestasjon i perioder på opptil 21 dager før prøvetaking. Prøve 1 ble foretatt på våren etter snøsmelt og før tunneler og vei ble vasket. De siste 17 dagene før prøvedagen hadde det kommet ca 46,8 mm nedbør. Prøve 2 ble tatt 10 dager etter prøve 1, i mellom tiden var det foretatt helvask av veibaner og tunneler, og det hadde i tillegg kommet 12,4 mm nedbør. Prøve 3 ble høstet 21 dager etter prøveuttak 2, og ingen vask var blitt utført siden siste prøve, men det hadde kommet 49,2 mm nedbør, det meste de siste dagene før. I tillegg viser målinger av mengde avrenningsvann (Meland et al. 2007) at en episode med høy mengde avrenning fant sted fra 10. – 16. mai. Denne episoden hadde flere ganger høyere mengde avrenning enn perioden med vasking 20. – 21. april. Prøve 4 ble tatt på høsten, og det var ikke foretatt vask av tunneler eller vei i forkant av prøvetakingen, heller ikke hadde det vært mye nedbør de siste ukene før prøven ble tatt, de siste 21 dagene hadde det kommet 45,6 mm. Etter sommeren hadde dammen, spesielt hovedbassenget stor algeoppblomstring, se figur 2.5, og vannstanden var relativt lav.



Figur 2.4, viser nedbørsmengder pr døgn i perioden 2.april til 21. sept. 2006 målt ved Ås målestasjon. (AgroMetBase 2007).



Figur 2.5, viser algeoppblomstringen i hovedbassenget ved Vassum under siste prøvetaking.

2.2 Isolering og dyrking av bakterier

2.2.1 Bestemmelse av antall dyrkbare og totalantall bakterier i vann og sediment

2.2.1.1 Platespredning

Vann- og sedimentprøver ble oppbevart kjølig ($\leq 4^{\circ}\text{C}$). Umiddelbart eller neste dag ble det foretatt platespredning for bestemmelse av antall dyrkbare bakterier ved CFU (colony forming

units). Prøvene ble fortynnet med sterilt vann og uttak på 0,1 ml ble avsatt på agarskåler. Prøvene ble strøket utover agaroverflaten med en Drigalski glasstav. For de tre første prøvene ble det benyttet næringsrik agar i form av KPG, og mer næringsfattig agar i form av R2A. I tillegg ble det innkubert ved 5, 10, 15 og 20°C. Prøve 4 ble kun dyrket på R2A ved 15°C, men i tillegg til ren agar ble prøvene også spredt på agar iblandet såpen Remikraft 703 i konsentrasjoner 0,125 %, 0,25 %, 0,5 % og 1 %. 1 % såpe tilsvarer ca. 100-500 µg/ml av hvert av de fire komponentene i såpen. Såpen ble blandet i riktig konsentrasjon i agaren mens den var og flytende. Alle prøvene 1-3 ble gjort i paralleller mens prøve 4 ble gjort trippelt.

2.2.1.2 Telling av kolonier og beregning av antall dyrkbare bakterier

Antall bakterier på skålene ble telt med noen dagers mellomrom opp til 33 dager etter spredning, og det ble beregnet antallet dyrkbare bakterier pr ml vann- eller sedimentprøve ved å regne gjennomsnittet av parallellene og gange dette med fortynningsfaktoren for deretter å regne ut gjennomsnittet av antallet ved de ulike fortynningene. Skåler med antall > 250 ble forkastet så lenge det var alternative fortynninger å benytte. Skåler med < 20 kolonier ble som regel regnet med dersom antallet stemte overens med antallet i nærmeste fortynning, dersom det var unaturlig få eller mange ble de forkastet. Noen skåler, særlig fra prøve 3 og 4 fikk soppforurensning, og disse ble også forkastet. For sammenligning av alle fire prøvene ble det brukt kun R2A ved 15°C da det var dette som ble brukt på prøve 4, og ved alle sammenligninger ble det kun benyttet antallet ved siste telling, dvs. det totale antallet dyrkbare bakterier pr ml.

2.2.1.3 Totaltall av bakterier

Fra prøve 4 ble det bestemt totaltall ved membranfiltrering og farging av cellene med SYBR-green (Noble & Fuhrman 1998)). Alle prøvene bortsett fra én sedimentprøve (4-6) ble fortynnet med 0,2 µm sterilfiltrert vann til 10^{-1} for vann og 10^{-3} for sedimentet, og 1, 5 og 10 ml av fortynningene ble med vakuumpumpe filtrert på Whatman Anodisc 25 0,2 µm filtre sammen med sterilfiltrert vann. Filtrene ble tørket i petriskåler og etter 10 dager farget i mørke med 100 µl SYBR-green bruksløsning i 20 min. Overskuddsfarge ble fjernet på tørkepapir, filtrene tørket i sterilbenk ved RT og deretter ble de oppbevart mørkt ved RT til mikroskopering. Etter tre dager ble filtrene montert med monteringsløsning (en dråpe under og en over) på objektglass og dekkglass ble lagt over. Preparatene ble mikroskopert i et Leica mikroskop under UV lys, med 100 x oljeimmersjonsobjektiv og 10 x okular med innmontert

rutenett. Antall bakterier i 30 tilfeldig valgte ruter av typen BCZ telles, og det beregnes totaltall bakterier i prøvene ut fra formelen

$$\text{Antall bakterier/ml} = \left(\frac{N * 2,01 * 10^6}{J} \right) * F$$

der N = gjennomsnittlig antall bakterier pr BCZ rute

J = mengde fortynnet prøve (1, 5 eller 10 ml) avsatt på filteret

$2,01 * 10^6$ = omregningsfaktor for BCZ-rutens areal til å gjelde hele filterets areal

F = fortynningsfaktor

Da det i disse første forsøkene ble benyttet såpe som ikke var sterilisert, ble det gjort et forsøk med 2%, 1%, 0,5%, 0,25% og 0,125% konsentrasjoner av såpen i sterilt vann, hvor 0,1 ml av hver konsentrasjon ble spredt på agarskåler med R2A for å se om det kunne finnes levende, dyrkbare bakterier i såpen. Skålene ble innkubert ved RT. I videre forsøk ble såpen sterilisert ved autoklaving før bruk.

2.2.2 Isolering av bakteriekulturer dyrkbare på Remikraft 703

2.2.2.1 Anlegging av renkulturer

Alt arbeid med kulturer og dyrkning i alle forsøk gjennom hele oppgaven ble utført i sterilbenk med sterile teknikker og sterilt utstyr. Ved bruk av såpe i agar- og flytende medium ble riktig konsentrasjon steril såpe blandet i sterilt agarmedium mens den var flytende, og i sterilt flytend medium ved overføring av medium til kolber.

Prøve 1 og 2: 12 kolonier fra hver prøve ble valgt fra agarskåler benyttet til CFU beregning, og disse ble podet med podenål til nye agarskåler med R2A. Enkeltkolonier ble tatt fra disse igjen og podet på nye skåler for å få de mest mulig renere. De til sammen 24 koloniene var valgt fra ulike temperaturer, agar, fortynninger, og fra forskjellige vann- og sedimentprøver. Det ble også prøvd å velge mest mulig forskjellige kolonier i forhold til vekst og utseende, og de som først vokste opp ble foretrukket for å selektere for hurtigvoksende bakterier. Når bakteriene hadde vokst godt ble de podet tre og tre sammen på agarskåler (R2A) tilsatt såpe i konsentrasjoner 1%, 0,5% og 0,25%, samt kontroller uten såpe. Etter tre dager hadde to

kulturer fra hver prøve vokst på såpefortynning 1%, og disse fire ble podet til nye skåler med såpe (1%) og overført ytterligere to ganger til nye skåler for å bli mest mulig renkulturer. Én kultur fra hver prøve stoppet etter hvert å vokse, så de to resterende ble overført til rystekulturer, E-kolber med 20 ml R2A medium og såpe i konsentrasjoner 1%, 0,5%, 0,25% og 0,125%. Disse ble navngitt som A (prøve 1) og B (prøve 2).

Prøve 3: Det ble gjort flere forsøk på å isolere renkulturer fra både agarskåler fra CFU forsøk og ved direkte dyrkning av vann- og sedimentprøver, men ingen kulturer fra denne prøven var i stand til å vokse på 1 % såpe.

Prøve 4: Det ble valgt fire kolonier fra agarskåler fra CFU forsøket. Koloniene så ulike ut og hadde vokst opp først, tre var fra 1% og en fra 0,5% såpekonsentrasjon, og de var fra alle tre dammene. Disse ble podet på nye skåler med 1%, 0,5%, 0,25% og 0,125% såpe, og deretter ble enkeltkolonier overført til ny agar tre ganger, deretter ble de podet til rystekulturer med R2A medium og samme forhold såpe/medium som før. Disse ble kalt E, F, G og H. Kultur H så ikke ut til å bli ren ved mikroskopering og ved gramfarging, og for å forsøke hemme veksten av gram negative bakterier, ble polymixin B tilsatt i 2 ml/100 ml agar med samme såpekonsentrasjoner som før, og kulturen podet på dette. Det ble dårlig vekst på disse skålene, så det ble forsøkt med 1ml penicillin pr 100 ml agar i stedet, samme såpekonsentrasjoner, for å hemme gram positive bakterier. I begge tilfeller ble skålene innkubet ved 20°C. Da det ble noe vekst på skåler med penicillin ble disse kulturene forsøkt overført til rystekulturer med såpekonsentrasjonene 1%, 0,5%, 0,25% og 0,125% uten penicillin.

Alle renkulturer ble innkubert ved 20°C til de hadde vokst ut og deretter ble de oppbevart kjølig ($\leq 4^{\circ}\text{C}$). Etter hvert ble kun 1% såpekonsentrasjonen av hver renkultur opprettholdt ved å inokulere 0,1 eller 1 ml fra kulturene til nye kolber hver 4.-6. uke. Det ble hele tiden arbeidet sterilt med renkulturene.

2.2.2.2 Anrikningskulturer

Til sammen 18 anrikningskulturer, én fra hver vann- og sedimentprøve, ble laget ved å inokulere 1 ml vann direkte eller sediment i 10^{-2} fortynning til 100 ml E-kolber med 20 ml R2A medium og såpe i passende konsentrasjoner. Fra prøve 1 og 2 ble det først forsøkt med såpe i konsentrasjoner 2,5% og 1,25% samt kontroller, men da det bare ble vekst i kontrollene ble det isteden gjort med såpekonsentrasjoner 0,5%, 0,25% og 0,125% samt kontroller, senere også 1%. Prøve 3 og 4 ble inokulert til 1% og 0,125% såpekonsentrasjoner. Etter 3,5 mnd var

det ingen vekst i prøve 3 og 4 på 1%, så 0,1 ml kultur fra 0,125% ble overført til nye kolber med 1% såpe. Anrikningskulturene ble laget 1-5 mnd etter prøvene ble tatt, avhengig av prøvedato, og de ble oppbevart kjølig ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) uten risting etter at de hadde vokst opp (ca en uke etter inokulering). Kulturene fra prøve 1 og 2 ble opprettholdt ved å inokulere 1 ml kultur til nye kolber med samme medium og såpekonsentrasjoner ca hver måned mens kulturene fra prøve 3 og 4 kun ble overført én gang, etter 9 uker.

2.3 Identifisering av bakterier

2.3.1 Fenotypisk karakterisering

2.3.1.1 Klassiske tester

Mikroskopering: Renkulturene ble mikroskopert i fasekontrastmikroskop (LEICA DMRE) for å se celleform, størrelse, evt. formasjoner og bevegelse.

Gramfarging: Kulturer fra prøve 1 og 2 med såpekonsentrasjon 0,5% ble brukt til gramfarging og deretter overført til de andre såpekonsentrasjonene for å kun ha én stamme av hver kultur. Fra prøve 4 ble alle fire såpekonsentrasjonene av hver rene kultur gramfarget, og deretter ble kun én konsentrasjon fra hver kultur inokulert til nye kolber. Alle kulturene var bare noen dager gamle når de ble farget. En dråpe kultur ble avsatt på og lett spredt utover et objektglass og lagt i sterilbenk for å tørke. Bakteriene ble fiksert ved at objektglasset raskt ble ført gjennom en flamme to-tre ganger. Objektglasset ble så plassert i en løsning av krystallfiolett i 1 min. og skyllet med sterilt vann. Så ble det plassert i en jod-jod-kalium løsning i 3 min., skyllet med sterilt vann, og vasket i 96 % etanol til all farge var fjernet. Deretter ble det farget i safranin løsning i 1 min., skylt med sterilt vann, og tørket forsiktig. Objektglassene ble så mikroskopert med immersjonsolje på brightfield i et Leica mikroskop med 100 x objektiv og 10 x okular.

Oksidase test: Alle såpekonsentrasjonene av renkulturene ble testet. Det ble benyttet Bactident Oxidase test strips dekket av N,N-dimethyl-1,4-fenylen diammonium diklorid og 1-naphthol. Testen ble utført ved å avsette en bit koloni fra agar med steril podenål på stripene.

Katalase test: Alle såpekonsentrasjonene av renkulturene ble testet. En dråpe reagens med 3 % H_2O_2 ble avsatt på et objektglass og en bit koloni fra agar ble tilført.

2.3.1.2 BIOLOG Test System

Alle renkulturene bortsett fra H ble benyttet fra rystekulturer, og alle konsentrasjonene (1%, 0,5%, 0,25% og 0,125%) ble brukt i to av renkulturene, E og F. 1% vokste ikke bra nok i de andre. Kulturene ble dyrket i 300 ml E-kolber med 75 ml medium og tilhørende såpekonsentrasjoner til de var godt utvokst, etter 2-7 dager. 50 ml kultur ble deretter overført til 50 ml sentrifugerør og sentrifugert ved RT og 4100 rpm (Sorvall^R RC-5B, Dupont) i 30-45 min., avhengig av størrelse på pellet som ble dannet. Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i 3-5 ml (avh. av størrelse på pellet) inoculation fluid. Deretter ble denne løsningen dråpevis tilsatt eget rør med 19 ml inoculation fluid til tettheten av celler var mellom 28 og 32, dette ble lest av i et colorimeter. Løsningen ble deretter overført til en steril petriskål og 145 µl ble avsatt i hver brønn i en GN2TM (gram negativ) BIOLOG mikroplate med 8-kanals pipette. Platene ble forseglet med parafilm for å ikke tørke ut, innkubert ved 20°C og lest av etter ca 24 og 48 timer i en BIOLOG MicroStation plateleser. Resultatene ble behandlet i BIOLOG MicroLogTM System 4.2 innstilt i forhold til kulturenes gram- og oksidase egenskaper. I tillegg til å identifisere kulturene til art ble det registrert hvilke typer karbonsubstrat kulturene kunne vokse på, og disse ble sammenlignet.

2.3.2 Molekylær karakterisering

DNA-ekstraksjon

Renkulturer voksende på 1 % såpe ble dyrket til de hadde god vekst, men ikke for lenge så kulturene ble gamle. QiAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) ble benyttet til alle seks renkulturene. Dersom ikke annet er oppgitt ble alle prøvene sentrifugert ved 13.000 rpm i RT, og alle prosedyrer foregikk ved RT. Pga. den ikke helt store veksten i kulturene når de vokste på såpe, ble det før ekstraheringen sentrifugert 1,5 ml kultur i 1,5 ml eppendorf rør til pellet ble dannet, og 1,3 ml av supernatanten ble fjernet. Pelleten ble resuspendert i resterende supernatant, og disse 200 µl ble overført til 2 ml mikrosentrifugerør og benyttet som kultur i ekstraheringen. Hver prøve ble tilsatt 1,4 ml Buffer ASL og blandet i 1 min. (alle blandinger ble utført med en yellow line vortex), for så å settes i vannbad ved 70°C i 5 min. slik at cellene lyserer lettere. Prøvene ble så blandet i 15 sek. og sentrifugert i 1 min. til pellet ble dannet. 1,2 ml av supernatanten ble overført til et nytt 2 ml rør, tilsatt en InhibitEX tablett og blandet i 1 min. til tablettene var fullstendig oppløst i væsken. Slik fikk den stå i 1 min. så inhibitorene kunne adsorberes til InhibitEX matriksen. Prøvene ble så sentrifugert i 3 min. til

pellet ble dannet av tablettrestene og supernatanten ble overført til et 1,5 ml eppendorf rør som ble sentrifugert i 3 min.. Deretter ble 200 µl av denne supernatanten overført til et nytt eppendorfrør med 15 µl Proteinase K og tilsatt 200 µl Buffer AL. Dette ble blandet i 15 sek. og deretter innkubert ved 70°C i 10 min.. Deretter ble 200 µl 96 % etanol tilsatt og alt ble blandet i og så sentrifugert kjapt for å få ned alle dråpene fra lokket og veggene av røret. Hele blandingen ble så overført til en QIAamp spin kolonne plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og sentrifugert i 1 min. slik at blandingen med lysatet havnet i oppsamlingsrøret mens DNA blir igjen på membranen i kolonnen, som ble plassert i et nytt oppsamlingsrør. 500 µl Buffer AW1 ble tilført kolonnen og alt ble sentrifugert i 1 min. Det samme ble gjentatt med Buffer AW2 i 3 min.. Deretter ble kolonnen plassert i et eppendorfrør og tilsatt 200 µl Buffer AE (elueringsbuffer) og innkubert 1 min. i RT for så å bli sentrifugert i 3 min.. DNA fulgte dermed bufferen gjennom kolonnen og ble løst i denne.

Etter ekstrahering ble alle DNA prøvene kjørt på 1 % agarose gel med 1 kb ladder (standardmarkør, Bioladder) for å se etter DNA produkt. Gelen ble laget ved at 0,5 g Sigma agarose ble blandet i 50 ml 1 x TAE buffer og varmet til kokepunktet. Deretter ble væsken avkjølt og tilsatt 1 dråpe etidiumbromid løsning (SIGMA Et.br. 0,625 mg/ml). Dette ble avkjølt i minst 20 min. til gelen stivnet, og satt i et BIO-RAD elektroforese kammer og dekket med 1 x TAE Buffer. I hver brønn i gelen ble det amplifisert 7 µl DNA templat blandet med 2 µl 10 x loading buffer som ble kjørt 1 time ved 80 Volt. Gelen ble fotografert under UV lys i en BIO-RAD Gel Doc 1000 tilknyttet dataprogrammet Quantity One. Prøvene som skulle benyttes til PCR i løpet av noen dager ble oppbevart i kjøleskap, andre prøver ble fryst.

PCR

Dersom det ikke vises DNA produkt på agarose gel, kan likevel PCR kjøres på prøvene, da det kreves mindre DNA for å få PCR produkt enn for å få resultat på gelen. Dersom det er mye DNA i prøvene kan templatet fortynnes til f.eks. 1/10 og 1/100 med sterilfiltrert (0,2 µm) vann før PCR kjøres. Hver PCR reaksjon som vist i tabell 2.2 ble utført i en GeneAmp2700 eller en Eppendorf Mastercycler Gradient ved denaturering 5 min. ved 94°C og deretter 35 sykluser med tre trinn: denaturering i 1 min. ved 94°C, 1 min. primerbinding ved 55°C og 1 min. DNA syntese ved 72°C, og deretter en 10 min. DNA syntese ved 72°C før avkjøling til 4°C. Deretter ble prøvene kjørt på agarose gel 1 % tilsvarende som for DNA templat med 1 kb ladder (Bioladder) for å se etter PCR produkt i form av bånd.

Tabell 2.2, innhold i hver enkelt PCR reaksjon.

Løsning	Volum
Templat	5 µl
Taq Buffer (fra <i>Thermus aquaticus</i>)	5 µl
Frie nukleotidbaser, til sammen 10 mM	4 µl
Primer 1F 25 mM	2 µl
Primer 5R 25 mM	2 µl
1 % BSA	0,5 µl
destillert H ₂ O	31 µl
Taq Polymerase	0,5 µl

Rense PCR produkt

PCR produktene ble renset med E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega BIO-TEK). Først ble de overført til sterile 1,5 ml eppendorf sentrifugerør, tilsatt 4,5 x volum Buffer C og blandet. Blandingen ble deretter overført til en HiBind® DNA kolonne i et 2 ml samlerør og sentrifugert ved 7000 rpm i 1 min. Væsken i samlerøret ble kastet og kolonnen ble tilsatt 700 µl DNA Wash Buffer fortynnet med 96% etanol, og sentrifugert ved 7000 rpm i 1 min. Dette ble gjentatt med 500 µl DNA Wash Buffer og deretter ble den tomme kolonnen sentrifugert raskt for å tørke. Den ble deretter plassert i et sterilt 1,5 ml eppendorf rør og tilsatt 40 µl Eluerings Buffer og sentrifugert ved 13.000 rpm i 1 min. Dette templatet ble så kjørt på agarose gel 1 % med 1 kb ladder som forklart over for å se at produktene var tilstede.

Sekvenseringsreaksjon

For å få ut ønskede sekvenser av DNA som var ekstrahert fra kulturene, ble sekvenseringsreaksjon Big Dye 3.1 med primere 1F, 15F og 16F benyttet. Det kjøres én reaksjon med hver primer for hver prøve, slik at alle renkulturene ender opp med tre sekvenser fra tre primere. Det ble brukt GeneAmp 2700 PCR maskin og reaksjonene som vist i tabell 2.3 gjennomgikk 25 sykluser med denaturering ved 96°C i 30 sek., primerbinding ved 50°C i 15 sek. og deretter DNA syntese ved 60°C i 4 min. Deretter ble prøvene kjølt ned til 4°C.

Tabell 2.3, sekvenseringsreaksjonen Big Dye 3.1 med primere 1F, 15F og 16F.

Løsning	Volum
Templat	5 µl
Primer 3,2 mol	1 µl
Reaction mix	2 µl
Sekvenseringsbuffer	3 µl
destillert H ₂ O	9 µl

Felling av sekvenseringsreaksjon

Alle de ferdige sekvenseringsproduktene ble tilsatt 52 µl 96 % EtOH, 2 µl 125 mM EDTA (pH=8) og 2 µl 3M Natriumacetat. Dette ble innkubert i 15 min. ved RT og sentrifugert i 30 min. også ved RT. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble vasket med 70 % EtOH og sentrifugert i 15 min. Den nye supernatanten (EtOH) ble deretter fjernet og pelleten fikk tørke i avtrekk 15-30 min. og ble deretter levert til sekvensering i en ABIPrism Analyser.

Sekvensbehandling

Primerne som ble brukt dannet tre ulike sekvenser med overlapp som kunne settes sammen til en hel sekvens med flest mulig kjente baser. Sekvensene ble åpnet i dataprogrammet BioEdit, hvor evt. usikre nukleotider i begynnelsen og slutten av sekvensen ble fjernet, deretter ble resten av sekvensene klippet ut og limet inn i et Word-dokument, hvor overlappene ble satt sammen og de ble til en sammenhengende sekvens. BLAST (Basic Local Alignment Tool) søkemotor ble brukt til å sammenligne sekvensen med kjente sekvenser i GeneBank. Det forekommer oftest flere stammer, arter og slekter som er svært like sekvensen som testes, så de mest relevante av disse ble vurdert.

2.4 Effekt av Remikraft 703 på bakterier

2.4.1 Vekstegenskaper

2.4.1.1 Optisk celletetthet

Ved å måle absorbans i en flytende prøve måles den optiske tettheten (OD) av partikler, og dermed cellemassen i prøven. På denne måten lar det seg gjøre å sammenligne flere prøver uten å måtte se celletall ved f.eks. platespredning. Det ble målt absorbans i anrikningskulturene fra prøve 1 og 2 etter fire (sedimenteringskammer) og seks (hovedbasseng) dager for å se etter forskjeller i vekst mellom de ulike såpekonsentrasjonene, kontrollen, og mellom alle prøvene. Prøvene var i paralleller, hvor den ene av hver prøve var innkubert på resting og den andre ikke, bortsett fra to prøver hvor alle var ristet. De som ble brukt i målingene var rekken med paralleller hvor kun to av de var ristet. Absorbans ble lest av i et Pharmacia Biotech Novaspec® II spektrofotometer ved bølgelengde 560 nm, og sterilt vann ble brukt som referanse. Alle kulturene fra sedimenteringskammeret ble fortynnet 1:1

med sterilt vann for å få verdier innenfor målekapasiteten til spektrofotometeret, mens prøvene fra hovedbassenget ble målt direkte.

2.4.1.2 Generasjonstid og vekstkurve

Noen få utvalgte kulturer ble brukt i vekstforsøk for å se forskjeller i vekstkurven når bakteriene utsettes for ulike konsentrasjoner av såpe i mediet. Forsøkene måtte startes flere ganger før den rette fortynningen og intervallene mellom uttak ble funnet. Platespredningene ble gjort i paralleller for alle fortynningene, og antall pr ml kultur ble regnet ved å ta gjennomsnitt av parallellene og gange dette med fortynningsfaktoren, for deretter å ta gjennomsnittet av alle fortynningene. Skåler med vekst > 20 og < 250 var med i forsøket. Der antallet kolonier var for høyt eller lavt ble antallet estimert ut fra antallet ved forrige og/eller neste uttak. Noen av såpekonsentrasjonene ble det ikke gjort uttak fra like ofte som andre, og i disse tilfellene ble antallet bakterier satt til det samme som det var ved siste uttak. Generasjonstiden i den eksponentielle vekstfasen for hver kultur ble beregnet med formelen

$$GT = \frac{\ln 2 * (T_2 - T_1)}{\ln N_2 - \ln N_1}$$

der T_1 og T_2 = timer som har gått ved hhv. begynnelsen og slutten av vekstfasen

N_1 og N_2 = antall celler ved hhv. T_1 og T_2

Renkultur

Én renkultur, F, voksende på 1% såpe ble benyttet i forsøket. Antall bakterier i kulturen ble ved mikroskopering estimert til $\sim 10^6$, og 1 ml av denne ble fortynnet slik at startkulturen skulle inneholde $\sim 10^5$ celler. 0,1 ml av denne ble inokulert til 300 ml E-kolber med 50 ml $\frac{1}{2}$ R2A medium og såpe i konsentrasjonene 2 %, 1%, 0,5%, 0,25% og 0,125%, samt kontroll uten såpe. Umiddelbart ble 0,1 ml tatt ut av hver kolbe, fortynnet til 10^{-1} og spredt på petriskåler med R2A agar. Slike uttak ble gjort flere ganger opp til 97 timer. Fortynningene økte med tiden, og de ble umiddelbart spredt på agar og innkubert ved 20°. Etter 28,5 og 97 timer ble også fortynningene av uttakene filtrert, farget med SYBR-green og mikroskopert i fluorescensmikroskop etter prosedyre beskrevet i kap. 2.2.1 for å sammenligne totaltallet med CFU.

Anrikningskulturer

Til sammen tre blandingskulturer fra prøve 1 og 2 ble benyttet i forsøket, valgt fordi de vokste godt på 1% såpe. Antall bakterier i kulturene ble estimert til $\sim 10^6$, og 1 ml av denne ble fortynnet slik at startkulturen skulle inneholde $\sim 10^5$ celler. 0,1 ml av den fortynnede kulturen ble inokulert til 300 ml E-kolber med 50 ml $\frac{1}{2}$ R2A medium og såpe i konsentrasjonene 1 % og 0,125%. Umiddelbart ble 0,1 ml tatt ut, fortynnet til 10^{-1} og spredt på petriskåler både med ren R2A agar og med agar og tilhørende konsentrasjon med såpe (1% eller 0,125%). Slike uttak ble gjort ca hver 12. time opp til 126 timer og de ble fortynnet mer etter hvert. Alle ble innkubert ved 20°C. Etter 24 og 126 timer ble også fortynningene fra uttakene farget og mikroskopert for totaltall etter prosedyre beskrevet i kap. 2.2.1.

2.4.2 Toleranse for såpen ved ulike konsentrasjoner

Den direkte og akutte giftigheten av såpen Remikraft 703 på renkulturer ble testet gjennom flere forsøk, for å se om såpen i ulike konsentrasjoner dreper bakteriene eller kun hemmer veksten. Renkulturene F og G fra dammen voksende på R2A medium med 1% såpe og en renkultur av *Escherichia coli* voksende på KPG medium ble testet. 0,1 ml kultur ble overført til UGB flasker med 5 ml destillert H₂O og såpe i konsentrasjoner 0,5%, 1% og 2% samt kontroll. Flaskene ble lett ristet med én gang, og før hvert uttak. Etter 2,5, 5 og 30 min. ble 0,1 ml tatt ut av hver flaske og inokulert i 100 ml E-kolber med 20 ml KPG medium. Kolbene med *E. coli* ble innkubert ved 36-38°C mens F og G ble innkubert med risting ved 20°C. *E. coli* vokste ikke etter å ha vært i kontrollene med kun sterilt vann, så siden kulturen kan ha vært noe gammel, ble 0,1 ml inokulert til ny kultur med KPG medium, og denne ble benyttet i et nytt forsøk. Denne gangen ble såpe i konsentrasjoner 0,1%, 0,5% og 1% testet, oppsettet var samme som det første forsøket beskrevet over. Samme forsøk som dette siste ble også utført på nytt to ganger hvor destillert H₂O ble erstattet med hhv. R2A og KPG. Betingelsene var samme som for de foregående forsøk.

For å underbygge resultater i disse forsøkene ble 0,1 ml av hver kultur *E. coli* og F overført til kolber med R2A medium og KPG medium med såpekonsentrasjoner 0,5%, 1% og 2%. *E. coli* ble innkubert ved 36-38°C mens F ble satt til risting ved RT.

2.4.3 Endringer i artssammensetning

Det ble utført DGGE for å få et bilde av antall arter som finnes i vannet og sedimentet i dammene i forhold til antall arter derfra som kan leve med 1% såpe, dvs. anrikningskulturene. Fem prøver ble testet, fire vann- og en sedimentprøve, og deres tilhørende anrikningskulturer på 1% såpe. Kulturene var ca 1 måned gamle. Prøvene som ble valgt var fra prøve 4 og gir et bilde av forskjeller mellom ulike lokaliteter i Vassum samt forskjeller i forhold til de to andre dammene. Dersom ikke annet er oppgitt blir alle trinn i prosedyrene utført i RT sterilt, og sentrifugering skjer ved 13.000 rpm ved RT.

Ekstrahering av DNA

Vannprøver: 350-500 ml vann ble filtrert gjennom en oppsats med Whatman Glass Microfibre filter 47 mm Ø i bunn og Millipore 0,2 µm Polycarbonate ISOPORE membrane filters over. Bakterier i vannet ble dermed festet til Millipore filtrene, og hvert filter ble klippet i flere små deler og lagt i to 1,5 ml eppendorfrør. Disse ble nedfryst umiddelbart frem til selve ekstraheringen av DNA, som ble gjort med CTAB og kloroform ekstraksjon. 500 µl forvarmet (55°C) lysis buffer (0,5% SDS + 20 µg/ml proteinase K) ble tilsatt hvert eppendorf rør og innkubert i vannbad ved 55°C i 30 min. for at cellene skulle lysere. Rørene ble ristet lett hvert 10. min. Deretter ble 80 µl 5M NaCl og 100 µl forvarmet (55°C) CTAB (10% (w/v) hexadecyltrimetylammonium bromid i 0,7% NaCl) tilsatt og godt blandet. Dette ble innkubert ved 65°C i 10 min., for så å bli tilsatt 500 µl kloroform:isoamylalkohol (24:1) og blandet igjen. Rørene ble så sentrifugert ved 13.000 rpm i 5 min. og toppfasen som ble dannet ble overført til nye eppendorf rør, hvor 360 µl isopropanol (80%) ble tilsatt. Dette ble ristet for hånd og deretter innkubert ved RT i 10 min. for så å bli sentrifugert (13.000 rpm) i 10 min. slik at pellet med DNA ble dannet. Supernatanten ble fjernet, og pelleten vasket med 70% iskald etanol og sentrifugert i 8 min. Supernatanten (etanolen) ble fjernet, og pelleten fikk tørke i sterilbenk før den ble resuspondert i 35 µl TE buffer. Slik ble den oppbevart kjølig eller fryst.

Sedimentprøve: DNA ble ekstrahert med Fast DNA® Spin® Kit (Soil) (Q-BIO gene). ~200 µl sediment ble plassert i en Lysing Matrix E Tube med en blanding av silika- og keramiske kuler, og tilsatt 780 µl Natrium Fosfat Buffer og 98 µl MT Buffer. Disse rørene ble så ristet i en Fast Prep® i 1 min. på 5,5 og deretter sentrifugert i 1 min. Supernatanten som ble dannet ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør og tilsatt 250 µl PPS reagens og ristet 10 ganger for hånd. Dette ble så sentrifugert i 5 min. til pellet ble dannet. Supernatanten ble overført til et 2

ml rør og tilsatt 1 ml Binding Matrix Suspension. Dette ble blandet for hånd i 2 min. slik at DNA kunne bindes til matriksen, og partikler synke til bunns, deretter ble det innkubert ved RT i 3 min. 500 µl av supernatanten ble deretter fjernet, og Binding Matrix ble resuspondert i gjenværende væske. 600 µl (ca halvparten) av denne blandingen ble overført til et SPINTM Filter i et oppsamlingsrør og sentrifugert i 1 min. Filtratet ble kastet og resten av væsken fra forrige trinn (Binding Matrix og supernatant) ble overført til filteret og prosedyren gjentatt. Deretter ble 500 µl SEWS-M tilført filteret og sentrifugert i 1 min. Filtratet ble kastet og filteret sentrifugert i oppsamlingsrøret i 2 min. for å tørke før det ble plassert i et eppendorfrør og lufttørket i 5 min. 50 µl DES (DNase/Pyrogen Free Water) ble tilført filteret og sentrifugert i 2 min. slik at DNA ble eluert og havnet i eppendorfrøret.

Kulturer: Fire av de fem kulturene var i god vekst på 1 % såpemedium og ble ekstrahert ved hjelp av QiaAmp DNA Stool Mini Kit. Prosedyren ble fulgt på samme måte som beskrevet for DNA ekstrahering i kap. 2.3.2. Den femte kulturen var en av de som ikke vokste på 1 % men som ble overført tidligere fra 0,125% til 1% og fremdeles ikke vokste særlig. Ved mikroskopering ble det observert et par celler. Det ble forsøkt med samme kit som for de andre kulturene, men ikke noe DNA eller PCR produkt ble dannet. Det ble deretter forsøkt med QiaAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) i følge protokollen og med Fast DNA Spin Kit (Soil) som beskrevet for sediment, og det ble forsøkt på nytt med QiaAmp DNA Stool Mini Kit. Fra denne siste prosedyren ble det observert PCR produkt på agarose gel, men det var mye støy rundt båndene. For å forsøke å fjerne dette ble PCR produktene rensset, men med samme resultat. DNA produktene ble også rensset med Wizard® DNA Clean-Up System (Promega) etter protokollen, men også her ble det støy rundt båndene, og kulturen er ikke med videre.

PCR

PCR ble utført på alle prøvene og PCR produktene ble rensset med E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit. Både prosedyre for PCR og rensing ble utført som beskrevet under metoder for molekylær karakterisering i kap. 2.3.2 og deretter kjørt på 1 % agarose gel. På tre av prøvene ble det ved en feil benyttet Master Mix med 10mM av hver nukleotidbase i stedet for 2,5 mM, dvs. 40 mM dNTP i stedet for 10 mM dNTP, men da det ble gode resultater på agarose gel ble det ikke utført ny PCR på disse.

PCR med GC-hale

I PCR med primere tilsatt en GC rik del ble det utført reaksjoner som beskrevet i tabell 2.4. Reaksjonene ble utført i GeneAmp 2700 maskin ved først denaturering i 5 min. ved 94°C, deretter 35 sykluser med 30 sek. denaturering ved 94°C, 30 sek. primerbinding ved 55°C og 1 min. DNA syntese ved 72°C, og til sist 1 x 10 min. DNA syntese ved 72°C før avkjøling til 4°C. Produktene ble kjørt på agarose gel som beskrevet tidligere, med 100 bp ladder (Bioladder).

Tabell 2.4, innhold i hver enkelt reaksjon med GC-hale

Løsning	Volum
Templat	5 µl
10 x Taq Buffer	5 µl
Frie nukleotidbaser, til sammen 10 mM	4 µl
Primer 8F-GC hale 25 mM	2 µl
Primer 518R 25 mM	2 µl
1 % BSA	0,5 µl
destillert H ₂ O	31 µl
Taq Polymerase	0,5 µl

Denaturerende Gradient-Gel Elektroforese (DGGE)

DGGE ble utført med geler laget som en gradient av urea/formamid. Gelen ble laget mellom to glassplater i egnet stativ for DGGE geler. Det ble først laget tre DGGE løsninger, high (58 %), low (40 %) og 0 (0 %). 10 ml av hver av high og low ble blandet med 10 µl TEMED (N,N,N,N – Tetrametyletylendiamin) og 70 µl APS (ammoniumpersulfat). Blandingene ble sugd opp i hver sin sprøyte og festet på BIO-RAD Gradient Delivery System. Ved å forsiktig vri hjulet på apparatet ble korrekt gradient av high og low konsentrasjon avsatt mellom glassplatene til ca 4 cm var igjen på toppen. Da gelen var polymerisert ble kammen for å danne brønner plassert mellom glassplatene på toppen av gelen, og 5 ml 0 løsning blandet med 4 µl TEMED og 40 µl APS ble tilsatt på toppen og fikk stå til dagen etter.

Den ferdige gelen ble plassert i et BIO-RAD DCode™ Universal Mutation Detection System dekket med 1 x TAE buffer, og etter oppvarming til 64°C ble brønnene tilsatt 10 µl templat (PCR produkt med GC hale) og 5 µl 6 x DGGE Loading Buffer til hver brønn. Gelene ble kjørt ved 160 V og 60°C i dette systemet i ca 4 timer eller til prøvene hadde vandret til bunnen av gelen. Når elektroforesen var ferdig ble gelen skyllet med 1 x TAE buffer og farget 1 time i mørke med SYBR-Gold. Deretter ble den skyllet med sterilt vann og fotografert under UV lys i en BIO-RAD Gel Doc 1000 tilknyttet dataprogrammet Quantity

One. Resultatene fra vann/sedimentprøvene ble visuelt sammenlignet med resultater fra kulturene.

2.4.4 Vekst på næringsfattig medium

Renkulturer

For å se om renkulturer isolert fra Vassum kan leve på et næringsfattig medium og evt. bruke såpe som karbonkilde, ble det gjort dyrkningsforsøk med renkulturene E og F på to typer modifisert R2A medium, hvor næringsstoffer som sukker, aminosyrer og proteiner ble fjernet. I stedet for disse stoffene ble NH_4Cl tilsatt, og i den ene typen medium, her kalt R2A1 ble gjærekstrakt beholdt men mengden minket, mens i R2A2 det fjernet sammen med de andre stoffene. Først ble 20 ml R2A1 medium i E-kolber tilsatt såpe i konsentrasjonene 1% og 0,125% og inokulert med 1 ml kultur E og F i hver sine kolber. Etter to dager var det synlig, men svak vekst i kolbene, og 0,1 ml fra hver kolbe ble inokulert i nye kolber med samme betingelser, dette for å rense mediet for næringsstoffer som kan ha blitt overført fra de opprinnelige kulturene i R2A. 0,1 ml ble også inokulert i kolber med R2A1 medium uten såpe for å se om bakteriene kunne vokse kun på mediet. Etter tre dager ble det overført 0,1 ml av forsøkskulturene med 1% såpe til kolber med R2A2 medium, samme såpekonsentrasjoner og kontroll.

Etter 10 dager for R2A1 og 7 dager for R2A2 forsøket ble kulturene mikroskopert for å se etter vekst. Etter ytterligere to dager ble et par utvalgte kulturer mikroskopert igjen. Etter 14 dager ble uttak fra kulturene med R2A1 enten direkte eller fortynnet (se tabell 2.5) spredt i paralleller på skåler med $\frac{1}{2}$ R2A agar. Etter 11 dager ble det samme gjort med kulturene på R2A2 medium, disse ble spredt på R2A agar. Skålene ble innkubert ved 20°C og telt etter syv dager.

Anrikningskulturer

Anrikningskulturer fra prøve 1 og 2 ble brukt i form av rystekulturer voksende på R2A med 1% og 0,125% såpe, her ble kultur fra 1% såpe inokulert til forsøk med 1% og kontroll uten såpe, og kultur fra 0,125% såpe ble inokulert til forsøk med samme konsentrasjon. Prøve 3 og 4 ble brukt i form av rystekulturer voksende på R2A med 0,125% såpe, og disse ble

inokulert til både forsøk med 0,125% og 1% såpe og kontroll. Kolber med 20 ml R2A1 medium ble tilsatt ulike konsentrasjoner av såpen og inokulert med 0,1 ml kultur.

Tabell 2.5, gir en oversikt over fortynninger for platespredning fra R2A1 og R2A2 renkulturer E og F.

Kultur	Såpekonsentrasjon	R2A1	R2A2
F	1%	Direkte 10^{-2}	Direkte 10^{-2}
	0,125%	Direkte 10^{-2}	Direkte 10^{-2}
	Kontroll	10^{-1} 10^{-3}	10^{-2} 10^{-4}
E	1%	Direkte 10^{-2}	10^{-2}
	0,125%	Direkte 10^{-2}	Direkte 10^{-2}
	Kontroll	10^{-2} 10^{-4}	10^{-2} 10^{-4}

2.4.5 Nedbrytning av komponenter i såpen (Remikraft 703)

Det ble gjort forsøk med fire renkulturer (utelatt B og H) og fire anrikningskulturer (1-1, 2-1, 3-1 og 4-1) med god vekst på 1% for å se om alkoholetoksilatene i såpen ble brutt ned av bakteriene. Tre av renkulturene var dyrket på R2A med 1% såpe fram til forsøket mens A var dyrket på 0,5% (tidligere dyrket vellykket på 1%). Anrikningskulturene ble valgt ettersom de hadde god vekst på 1% og fordi alle var fra sedimenteringskammeret. 100 ml E-kolber med bomullspropp ble sterilisert og fylt med 20 ml $\frac{1}{2}$ R2A medium tilsatt 1% eller 0,25% såpe tilsvarende hhv. ca. 100-500 $\mu\text{g/ml}$ og 25-125 $\mu\text{g/ml}$ alkoholetoksilat. 0,1 ml kultur ble inokulert til hver kolbe, alle kulturene på begge såpekonsentrasjoner og i paralleller. I tillegg ble én parallell av hver såpekonsentrasjon av kulturene F og 4-1 tilsatt 10 ml medium med såpe ekstra før inokulering av kultur, deretter ble 10 ml fra disse kolbene tatt ut og over i glassflasker vasket i deionisert dH_2O , og levert til Bioforsk for analyse av innholdet av alkoholetoksilatene C9, C10 og C11. Alle kulturene fikk deretter stå i 14 dager på resting ved 20°C før 12-14 ml av én parallell av hver kultur ble overført til 15 ml sentrifugerør og sentrifugert ved 4100 rpm i 15 min. slik at cellene skulle danne pellet. Supernatanten ble helt over i glassflasker vasket i deionisert destillert H_2O og levert til Bioforsk for analyse av samme alkoholetoksilater, for å se om en nedbrytning av disse var funnet sted. I tillegg ble det analysert en prøve av $\frac{1}{2}$ R2A uten såpe og uten kultur for å se bakgrunnen i prøvene, og det ble analysert én prøve medium med 0,125 % såpe og 1 % såpe uten kultur som ble

innkubert oksygenrikt men uten risting ved RT i 14 dager, for å se om det var endringer i mengden alkoholetoksilater uten at biologisk nedbrytning hadde funnet sted.

2.5 Dyrkning på olje, diesel og PAH

Fem renkulturer og syv anrikningskulturer (alle sedimenteringskammer vann og sediment) ble testet om de kunne benytte PAH, olje og diesel som karbonkilde ved å dyrke de på næringsfattig medium (BMM – basalmedium) tilsatt forurensning. Elleve av kulturene vokste på 1% såpe, én anrikningskultur kun på 0,125%. 100 ml E-kolber ble fylt med 20 ml BMM og tilsatt 1 ml autoklavert diesel eller 1 ml autoklavert Solvent Neutral 90 Basis Olje. Fenantren ble løst i aceton 1 g/50 ml, og 1 ml av denne løsningen ble tilsatt en tom, steril E-kolbe med bomullspropp. Proppen ble løsnet og kolben fikk stå i avtrekkskap til acetonet hadde fordampet og fenantren lå igjen i bunnen. Deretter ble 20 ml BMM tilsatt hver kolbe. Alle 12 kulturene ble testet på hver forurensning og kontroll ved at 0,1 ml kultur ble inokulert, og forsøket ble gjort i paralleller. Kolbene ble satt på risting ved 20°C i opptil seks uker.

2.6 Gassanalyser av sediment

Da det ble observert gass i form av bobler i vannet fra sedimentet ved innsamling av prøver ble det ved gasskromatografi undersøkt hvilken gass som befant seg i sedimentene. Tre sedimentprøver fra ulike steder i dammen ble tatt i prøve 3.5 g av hver prøve ble veid opp og blandet i 45 ml sterilt vann i glassflasker forseglet med membrankork, i disse var det dermed 1:1 vann/sediment og luft. Flaskene ble ristet godt og innkubert ved 20°C i 129 dager, da det ble gjort en måling. Deretter ble flaskene innkubert ved RT i ytterligere 161 dager, hvorpå siste måling ble utført, etter til sammen 290 dager innkubert. Gassen ble trukket ut fra glassflaskene med en mikrosprøyte som ble stukket gjennom membranen, og stempelet ble presset ut og inn et par ganger, for deretter å være helt ute i ca 30 sek. så gass kunne sige inn i sprøyten. 0,5 ml gass ble tatt ut, og dette ble injisert inn i en Perkin Elmer Autosystem Gas Chromatograph og analysert med Thermal Conductivity Detector (TCD) og Flame Ionization Detector (FID). Helium ble brukt som bæregass, injektortemperatur var 200°C og detektortemperatur 250°C. Som referanser ble det også brukt to luftprøver fra korridoren i bygget. TCD gir CO₂, O₂ og N₂ som topper i kurvene, og FID viser CH₄ som to topper. Kurvene er delt inn i to deler, den første, Porapac gir hhv. CO₂ og CH₄ i TCD og FID, mens

Molekylsil A gir O₂ og N₂ i TCD og CH₄ i FID. Dersom det er store mengder CH₄ i prøven vil dette også vises som små topper i TCD kurven, men for å måle ordentlig må det benyttes FID, da denne er mer følsom for CH₄.

Det ble beregnet ppm for CH₄ i prøvene ved å omregne fra kjent ppm for CH₄ i luft som er ~2 ppm. Formelen som ble brukt var:

$$\text{ppm CH}_4 \text{ i prøven} = \frac{\text{Areal P}}{\text{Areal L} / 2 \text{ ppm}}$$

der Areal P = areal av CH₄ i prøven

Areal L = areal av CH₄ i luftprøven som benyttes som referanse

2 ppm = andel CH₄ i luft (standard)

Et gjennomsnitt av de to toppene fra CH₄ ble brukt i utregningen.

For å utelukke muligheten for at gassen i sedimentene kunne bestå av H₂S, ble gassen også testet på blyacetatpapir. Gass fra flaskene med sedimentprøver ble trekt ut med en mikrosprøyte, og blåst direkte på papiret. Dersom det er H₂S i gassen vil denne reagere med Pb og gi svart farge på papiret. For å sjekke at Pbacetatpapiret fungerte som det skulle ble det også gjort en test med gass fra reaktorslam med kjent innhold av natriumsulfid.

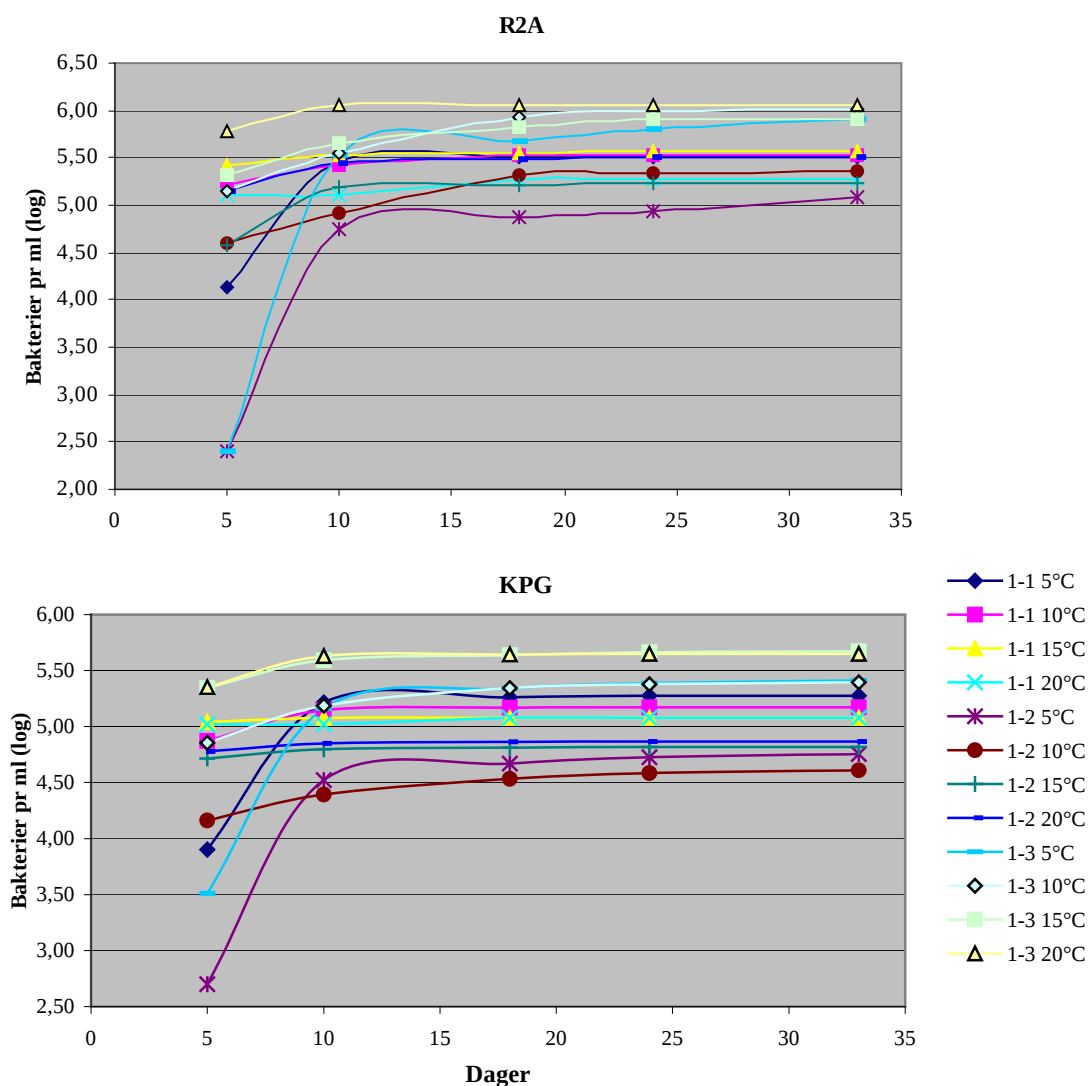
Beregning av prosent O₂, N₂ og CO₂ ble gjort fra arealet via omregningsfaktorer 0,0001401 (O₂), 0,0001385 (N₂) og 0,00035844 (CO₂).

3. Resultater

3.1 Isolering og dyrking av bakterier

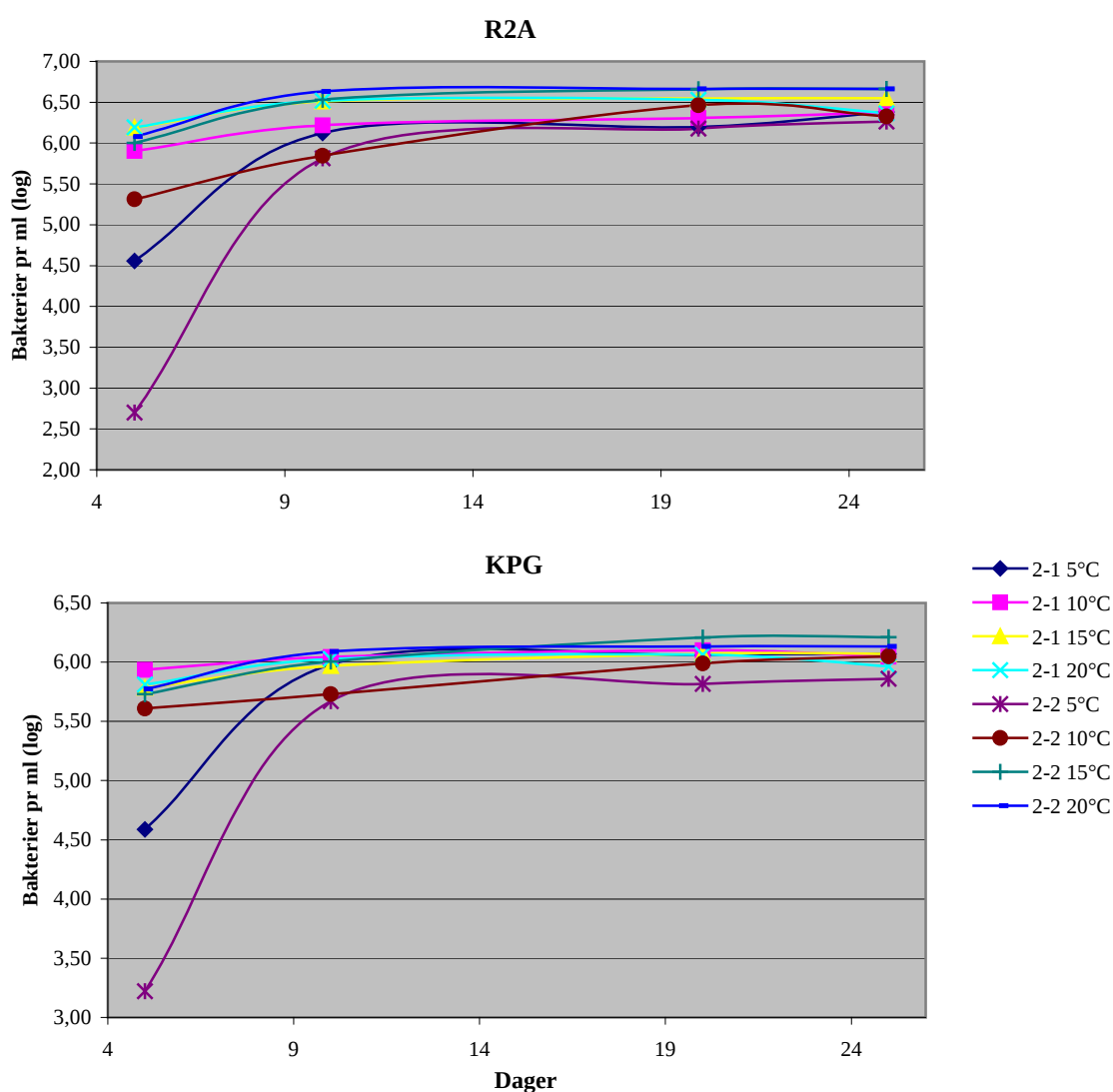
3.1.1 Bestemmelse av antall dyrkbare og totalantall

Fra de tre første prøvene ble det utført CFU med innkubering på to typer agar og ved ulike temperaturer. Figur 3.1, 3.2 og 3.3 viser hovedtrekkene fra hhv. prøve 1, 2 og 3 i form antall bakterier pr ml i prøvene beregnet ut fra antall kolonier på skålene og gitt ved de to faktorene temperatur og agar. Vekstkurven er målt ved antall kolonier, og ved lavere temperatur bruker

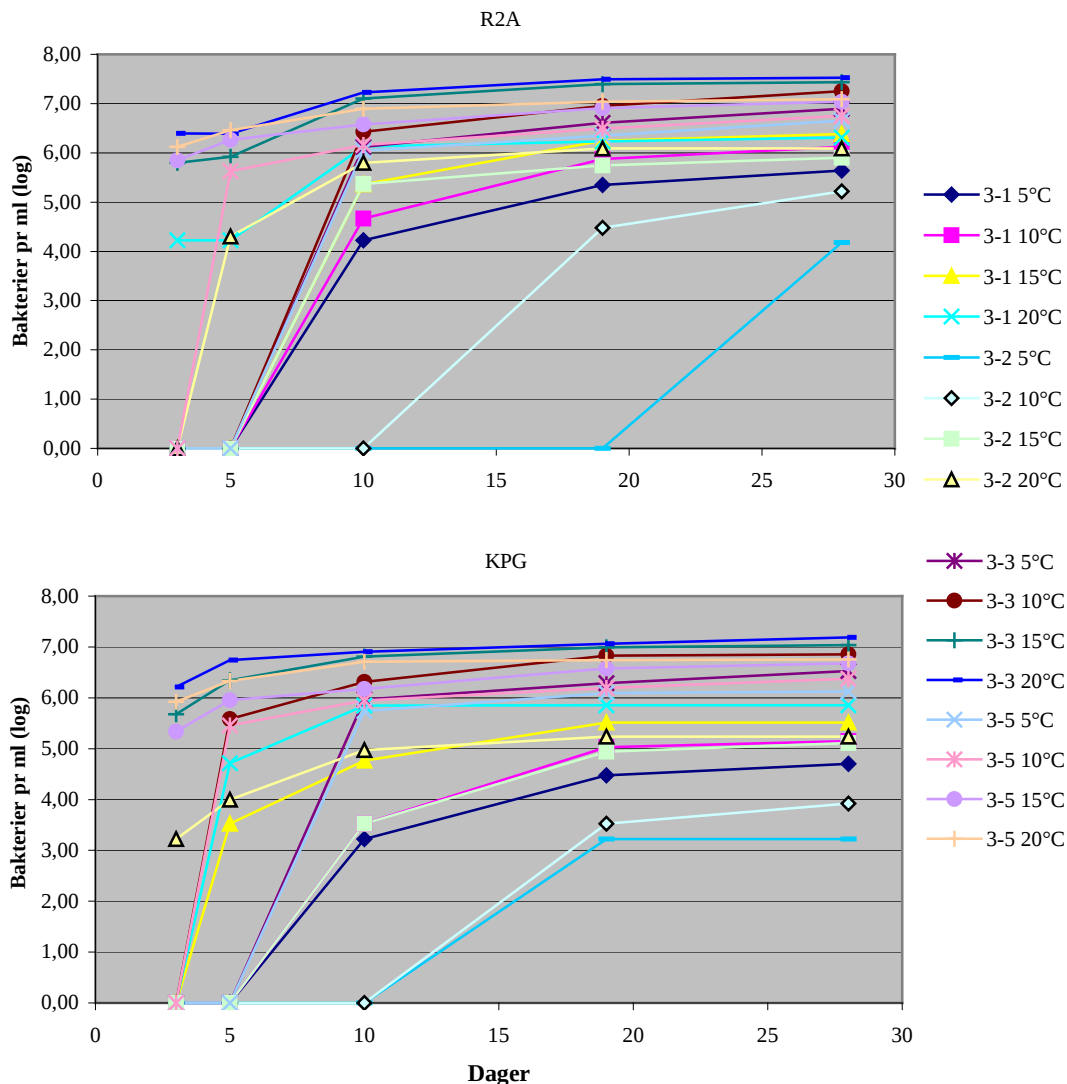


Figur 3.1, fra prøve 1 og viser vekst på agarskålene i form av antall bakterier pr ml prøve (vann eller sediment), i forhold til utviklingen av kolonier etter antall dager innkubert ved ulike temperaturer, og ulikheter mellom de to agartypene som ble benyttet. Forklaring til grafene: SK = 1-1, HB = 1-2 og Sed = 1-3. 5, 10, 15 og 20 er de ulike temperatuene.

koloniene lengre tid på å vokse opp, og selv etter siste telling er det færre bakterier ved 5°C enn ved 20°C. Forskjellene mellom temperaturene vises også i figur 3.4. Det er også forskjeller i vekst på de to agarene, antallet ligger litt høyere på R2A, her er totalantallet (sist telt) gjennomsnittlig $3,76 \cdot 10^5$ mens det på KPG er $1,38 \cdot 10^5$ i prøve 1, $2,88 \cdot 10^6$ på R2A mot $1,08 \cdot 10^6$ på KPG i prøve 2 og $7,16 \cdot 10^5$ på R2A mot $1,6 \cdot 10^5$ på KPG i prøve 3. Det er også betydelig flere bakterier i sedimenteringskammeret enn i hovedbassenget i de fleste vannprøvene, men ikke i sedimentprøvene, og det er også et høyere antall i sedimentene enn i vannet, som forventet. Dette vises også i senere figurer.

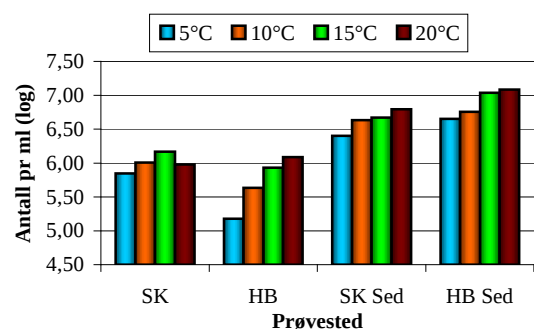


Figur 3.2, fra prøve 2 viser vekst på agarskålene i form av antall bakterier pr ml vannprøve, i forhold til utviklingen av kolonier etter antall dager innkubert ved ulike temperaturer, og ulikheter mellom de to agartypene som ble benyttet.



Figur 3.3, er fra prøve 3 og viser vekst på agar-skålene i form av antall bakterier pr ml prøve (vann eller sediment), i forhold til utviklingen av kolonier etter antall dager innkubert ved ulike temperaturer, og ulikheter mellom de to agartypene som ble benyttet.

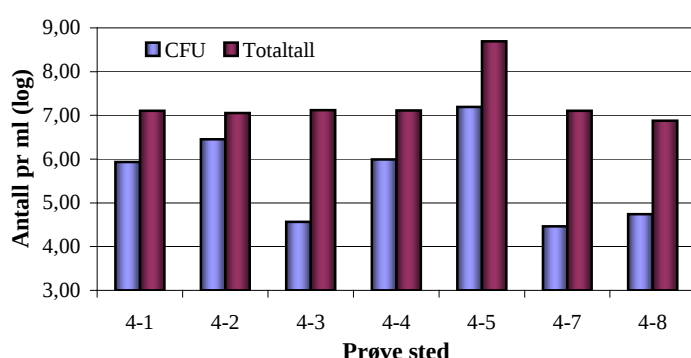
Figur 3.4 viser bakterier pr ml for prøve 1, 2 og 3 fordelt på prøvestedene og i forhold til temperaturen for å se hvor mye innvirkning denne hadde på den totale veksten og ikke bare på utvikling av kolonier. Antall bakterier øker når temperaturen øker, bortsett fra sedimenteringskammeret ved 20°C, her er antallet lavere enn ved 15°C. Dette kommer kun av prøve 1, som drar ned gjennomsnittet, og denne er mest sannsynlig kun en feil og ikke representativt for dataene. Den



Figur 3.4, viser antall bakterier ved hvert sted i forhold til temperaturen de vokste ved. Forklaringer: SK = gj. snitt av 1-1, 2-1 og 3-1, HB = gj. snitt av 1-2, 2-2 og 3-2, SK Sed = gj. snitt av 1-3 og 3-3 og HB Sed = 3-5.

største forskjellen mellom temperaturene ser ut til å være mellom 10 og 15°C, og i de største sprikene i antall er i hovedbassenget, det ser ut til at bakteriene i denne prøven vokser dårligere enn de andre på lavere temperatur.

Som vist i figur 3.4 vil resultatene fra prøve 4 kunne gi lavere verdier enn faktisk antall dyrkbare bakterier i dammen, da de er dyrket ved 15°C og høyere antall kolonier ble observert ved 20°C, men målet var i hovedsak å se ulikhetene mellom de fire prøvene og mellom stedene i dammen, og antallet ved 15°C vil kunne være representativt nok for sammenligning av dette. Det vil alltid være flere bakterier ved bruk av totaltall enn ved dyrkbart antall som sett i figur 3.5, og i disse prøvene ligger totaltallet av bakterier pr ml fra ca 5 til ca 150 ganger høyere. Antallet ved de ulike vannprøvene i dammene er i følge totaltallet relativt det samme både på de ulike stedene og i de tre dammene, mens det dyrkbare antallet varierer en god del. Sistnevnte gir vesentlig lavere antall i hovedbassenget i forhold til sedimenteringskammeret

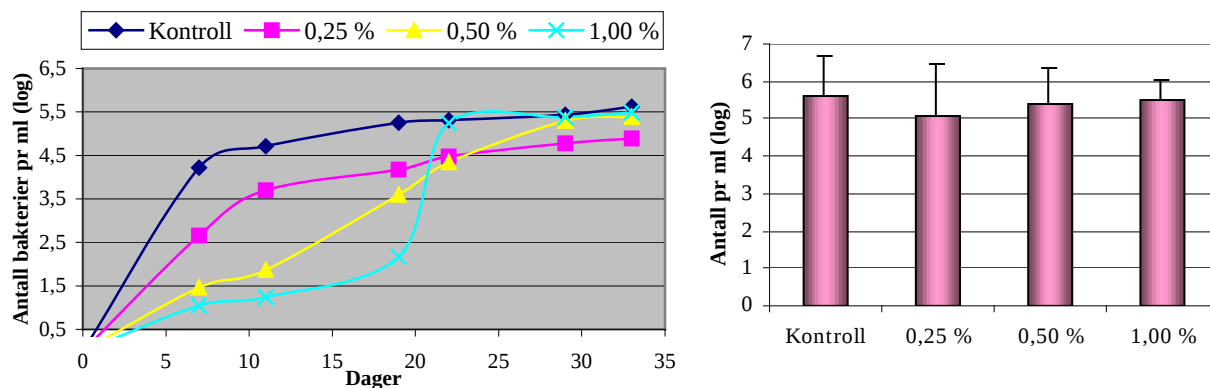


Figur 3.5, CFU og totaltall for prøvestedene 21.09.06. CFU er kun kontroll uten såpe.

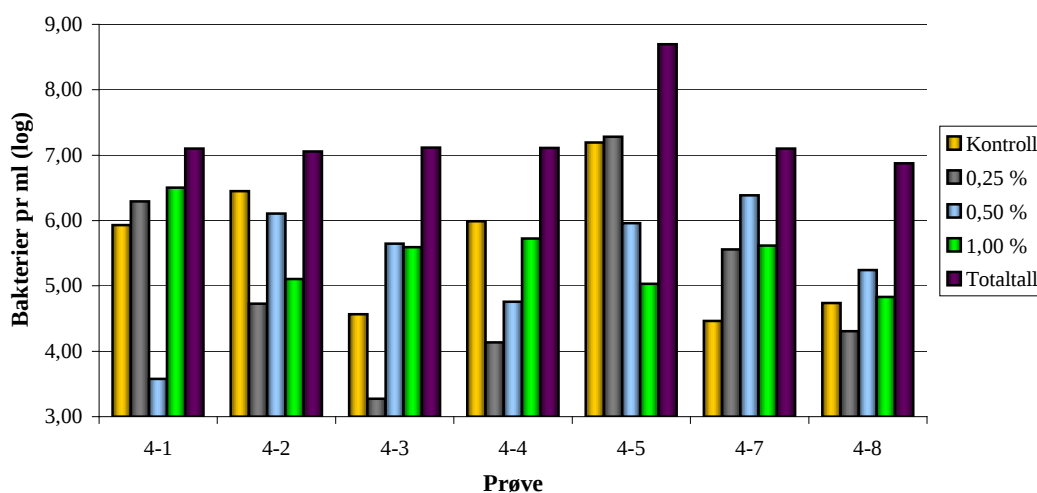
og kummen i Vassum, og mellom de tre dammene er antallet Vassum > Taraldrud > Skullerud, mens det i følge totaltallet er Vassum = Skullerud > Taraldrud. Forskjellen mellom sedimentprøve og vannprøve er derimot tydelig både som totaltall og dyrkbart antall, dvs. antallet er høyere i sedimentet.

I figur 3.6 ser man veksten på agarskålene i forhold til såpeinnholdet i agaren. Det tar lengre tid for bakteriene og vokse opp når de utsettes for såpe, ved den høyeste konsentrasjonen er det få bakterier de første 20 dagene. Det er først når såpekonsentrasjonen er så lav som 0,25% at man får vekst hurtigere, men likevel mindre vekst enn i kontrollene uten såpe. Imidlertid viser det seg at det etter 33 dager ikke er noen sammenheng mellom antall bakterier og såpekonsentrasjonene. Det er gjennomsnittlig mest vekst på agar uten såpe, men når det gjelder skåler med såpe øker veksten med økt såpeinnhold. Som man ser i figur 3.7 er det ingen korrelasjon mellom prøvesteder og evne til å dyrkes på såpe, og som nevnt tidligere, heller ingen korrelasjon mellom såpekonsentrasjon og vekst. Innenfor de ulike

såpekonsentrasjonene varierer veksten i de ulike prøvene mye, og for hver prøve er mønsteret for vekst på/uten såpe ulikt slik at det er virker helt tilfeldig at såpen er tilstede.



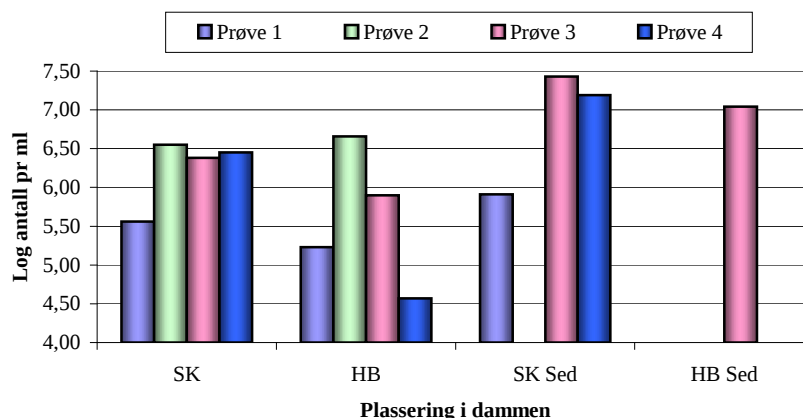
Figur 3.6, venstre: vekst på agarskålene fra prøve 4 i forhold til såpeinnholdet i agaren og tidspunkt skålene ble telt. Antallet pr ml er gjennomsnitt av alle syv prøvene som ble dyrket for CFU, dvs. 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-7 og 4-8. Høyre: antallet bakterier pr ml i form av gjennomsnittet mellom alle prøvestedene i forhold til såpekonsentrasjonen i agaren, med standardavvik for variasjon mellom prøvestedene.



Figur 3.7, viser antall bakterier pr ml gitt i forhold til vekst på agar med ulike såpekonsentrasjoner (%) og i forhold til de ulike stedene i dammene. I tillegg er totaltallene med.

Videre er det kun tatt utgangspunkt i de siste tellingene av skålene slik at det totale antallet dyrkbare bakterier i vannet eller sedimentet er med, og fra prøve 1, 2 og 3 er kun R2A og 15 °C benyttet som parameter for å kunne sammenligne med prøve 4, og bare resultater fra Vassum er med. Figur 3.8 viser antallet bakterier ved de ulike stedene i dammen i de fire prøvene. Det er som tidligere også her klart at sedimentene har høyere antall bakterier pr ml enn vannet, og at sedimenteringskammeret med unntak av prøve 2 har høyere antall enn hovedbassenget både når det gjelder vann og sediment. I tillegg har prøve 1 lavere antall

bakterier enn de andre tre, prøve 2 ser ut til å ha mest, deretter prøve 3, og prøve 4 ($2 > 3 > 4 > 1$), og dette ser ut til å gjelde uavhengig av plassering i dammen.



Figur 3.8, viser antallet bakterier i dammen fordelt på de ulike prøvene og stedene. Forklaring: SK = 1-1, 2-1, 3-1 og 4-2. HB = 1-2, 2-2, 3-2 og 4-3. SK Sed = 1-3, 3-1 og 4-5. HB Sed = 3-5.

Agarskålene med fortynninger av ikke steril såpe ble undersøkt i opptil 13 dager, og ingen tegn til vekst ble observert på noen av skålene.

3.1.2 Isolering av bakteriekulturer dyrkbare på Remikraft 703

3.1.2.1 Anlegging av renkulturer

Valgt ut ifra evne til å vokse på medium tilsatt opptil 1% såpe, ble til sammen seks renkulturer isolert fra de tre dammene. Tabell 3.1 viser en oversikt over renkulturene som er isolert fra dammen og deres opprinnelse og navn i forsøkene. Renkultur H ble dyrket på penicillin en periode og overført til nye agarskåler ofte pga. at den ikke var ren, men etter hvert som den ble renere så den ut til å miste evnen til å vokse på 1% såpe, og den er derfor ikke med i alle forsøkene. I rystekulturer flokkulerte koloniene og den var også derfor vanskelig å bruke.

Tabell 3.1, renkulturene og deres opprinnelse.

Navn	Dyrket på	Opprinnelse
A	R2A + ½ R2A, ≤ 1%	1-1
B	R2A + ½ R2A, ≤ 1%	2-1
E	R2A + ½ R2A, ≤ 1%	4-1
F	R2A + ½ R2A, ≤ 1%	4-5
G	R2A + ½ R2A, ≤ 1%	4-7
H	R2A + ½ R2A, ≤ 0,5%	4-8

3.1.2.2 Anrikningskulturer

De første kulturene som ble laget fra prøve 1 og 2 på 1,25 % og 2,5 % såpe ble det ingen vekst i. Det ble senere laget anrikningskulturer fra alle 18 prøvestedene med lavere såpekonsentrasjoner, men ikke alle vokste på 1% såpe. Tabell 3.2 gir en oversikt over kulturene og deres navn og opprinnelse, antall overføringer til nye kulturer, samt evne til å vokse på ulike såpekonsentrasjoner. Kulturene som ble laget fra prøve 3 og 4 hovedbasseng var ikke dyrkbare på såpe konsentrasjon 1 %, og generelt var det bestandig mest vekst i 0,125 % enn i 1 %.

Tabell 3.2, anrikningskulturer, **A** fra prøve 1 og 2, **B** fra prøve 3 og 4.

A

Navn og opprinnelse	Såpekons.	Ny kultur etter 36-39 dager til såpekons.	Ny overføring etter 3,5 måned
1-1	Kontroll, 0,125%, 0,25%, 0,5%	0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%	0,125% og 1%.
1-2	Kontroll, 0,125%, 0,25%, 0,5%	0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%	0,125% og 1%.
1-3	Kontroll, 0,125%, 0,25%, 0,5%	0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%	0,125% og 1%.
2-1	Kontroll, 0,125%, 0,25%, 0,5%	0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%	0,125% og 1%.
2-2	Kontroll, 0,125%, 0,25%, 0,5%	0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%	0,125% og 1%.

NB! Det var også to overføringer hhv. 14 og 28 dager etter 36-39 dager.

B

Prøve	Såpekons.	Vekst etter 75 d	Inokulering etter 45 d	Vekst i 1%
3-1	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
3-2	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Nei
3-3	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
3-4	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
3-5	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
4-1	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
4-2	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
-3	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Nei
4-4	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
4-5	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
4-6	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
4-7	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja
4-8	0,125% og 1%.	0,125%	Fra 0,125% til 1%	Ja

NB! Etter 75 dager ble både 0,125% og 1% kulturene overført til nye kulturer med samme såpekonsentrasjon, i tilfelle 1% ville komme seg, noe de ikke gjorde.

3.2 Identifisering av bakterier

3.2.1 Fenotypisk karakterisering

3.2.1.1 Klassiske tester

Tabell 3.3 gir en oversikt over observasjoner og resultater fra de klassiske testene som ble utført med renkulturene. For noen av isolatene ble kulturer på alle fire såpekonsentrasjoner testet, men resultatene er gitt som én stamme dersom ikke annet er nevnt eller de var ulike. Ved utvelgelse av stammene ble det lagt mest mulig vekt på å få ulike kolonier, men bortsett fra utseende og vekstmønster på agar og lengde på cellene var isolatene A-G stort sett like, gram negative staver som er oksidase og katalase positive. H derimot var helt annerledes, men kunne heller ikke vokse like godt på såpen og noen av testene var derfor vanskelig å gjennomføre.

Tabell 3.3, gir oversikt over observasjoner fra de klassiske testene av renkulturene

Kultur	Kolonier på agar	Mikroskopering	Gramfarging	Oksidase	Katalase
A	Gule kolonier, svake i fargen, men store	Korte staver eller ovale bakterier, noen danner kjeder på to eller flere celler, mange med bevegelse	Negativ	Positiv	Positiv
B	Veldig svake, nesten usynlige, men store	Ovale bakterier, noen danner kjeder to og to	Negativ	Positiv	Positiv
E	Hvite, vokser utover tykt	Lange staver, mange med egenbevegelse	Negativ	Klart positiv ^a	Positiv
F	Gule, tykke	Staver med mye egenbevegelse	Negativ	Klart positiv ^a	Positiv
G	Svak hvit, nesten grå, tåkete vekst	Korte staver, noen danner kjeder, mange i bevegelse	Negativ	Klart positiv ^a	Positiv
H	Rosa, veldig små	Coccer eller korte staver, ingen bevegelse, ingen kjeder	Positiv og negativ, ble mest negativ etter dyrking på penicillin, men fremdeles usikker	Mest sannsynlig positiv, men vanskelig å avgjøre pga. rosa kolonier	Positiv

^a = dersom stripen blir blå etter ≤ 20 sekunder er prøven klar positiv, etter 20 sekunder er den ikke så klart positiv

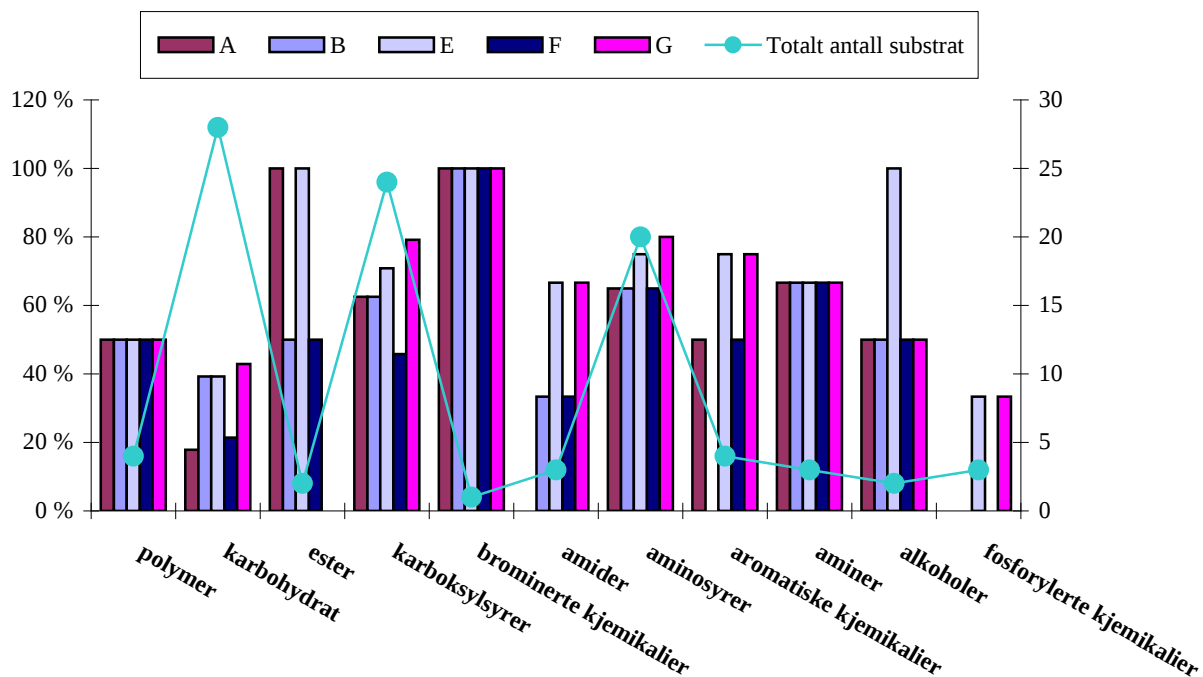
3.2.1.2 BIOLOG Test System

Tabell 3.4 viser artene fra BIOLOG med høyest sannsynlighet for å være isolatene fra dammene. Da fargingen av brønnene i platene ikke er reversibel, går jeg ut fra at resultatene etter 2 døgn er korrekte. Isolatene på ulike såpekonsentrasjoner innen en stamme gir i noen tilfeller ulike resultater, men det ble etter BIOLOG brukt kun én av såpekonsentrasjonene til å lage nye kulturer (merket med rosa i tabellen), dvs. renkultur A er *Pseudomonas fluorescens* biotype G, renkultur B, E og G er *P. fluorescens* biotype F, og renkultur F er ikke identifisert.

Tabell 3.4. gir en oversikt over resultatene fra BIOLOG for de ulike renkulturene på forskjellige såpekonsentrasjoner. Stammene merket med rosa er de som benyttes i senere forsøk og dermed er de viktigste. Prob. = sannsynligheten for at undersøkt kultur er den gitte stammen, Sim = likheten i "metabolic fingerprint" mellom kulturen som undersøkes og stammen som finnes i databasen. Samtlige slekter er *Pseudomonas*.

Kultur	1 døgn	Prob	Sim	2 døgn	Prob	Sim
A 0,5%	<i>P. putida</i> biotype B	100%	0,61	<i>P. fluorescens</i> biotype G	100%	0,47
A 0,25%	<i>P. putida</i> biotype B	100%	0,52	<i>P. putida</i> biotype B	0%	0,30
A 0,125%	<i>P. fluorescens</i>	0%	0,42	<i>P. fluorescens</i>	100%	0,61
B 0,5%	<i>P. fluorescens</i> biotype F	0%	0,45	<i>P. fluorescens</i> biotype F	0%	0,47
B 0,25%	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,60	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,61
B 0,125%	<i>P. fluorescens</i> biotype F	0%	0,48	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,50
E 1%	<i>P. synxantha</i>	0%	0,32	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,79
E 0,5%	<i>P. fluorescens</i> biotype F	96%	0,68	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,79
E 0,25%	<i>P. fluorescens</i> biotype F	0%	0,47	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,71
E 0,125%	<i>P. fluorescens</i>	92%	0,70	<i>P. fluorescens</i> biotype F	100%	0,71
F 1%	<i>P. putida</i> biotype B	0%	0,31	<i>P. aeruginosa</i>	0%	0,31
F 0,5%	<i>P. nitroreducens/azelaica</i>	0%	0,42	<i>P. fluorescens</i> biotype C	0%	0,19
				<i>P. fluorescens</i> biotype G	0%	0,10
F 0,25%	<i>P. maculicola</i>	0%	0,23	<i>P. maculicola</i>	0%	0,18
F 0,125%	<i>P. nitroreducens/azelaica</i>	95%	0,85	<i>P. maculicola</i>	0%	0,44
G 0,5%	<i>P. fluorescens</i>	91%	0,70	<i>P. fluorescens</i> biotype F	99%	0,71
G 0,25%	<i>P. fluorescens</i>	0%	0,48	<i>P. fluorescens</i> biotype F	0%	0,36
G 0,125%	<i>P. fluorescens</i>	98%	0,58	<i>P. fluorescens</i> biotype F	96%	0,74

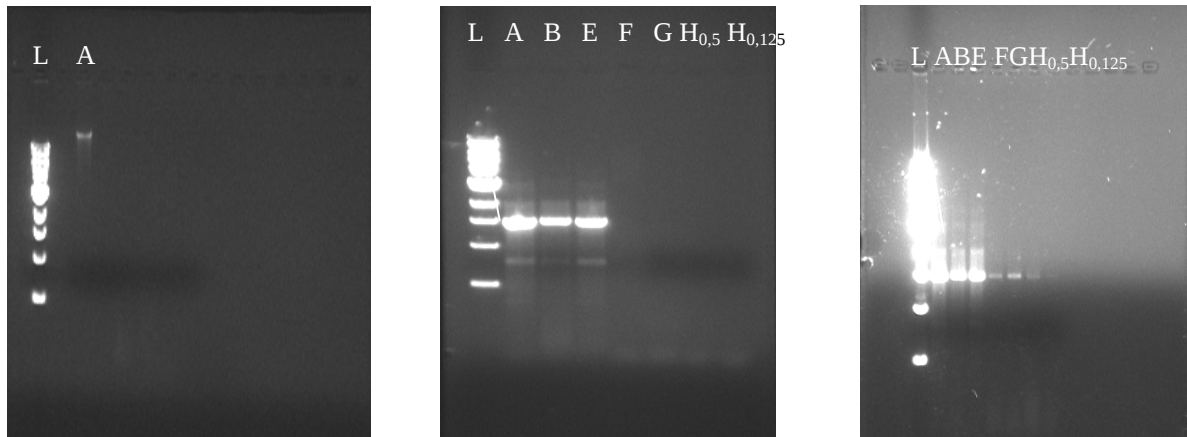
Resultatene fra BIOLOG gir også en oversikt over hvilke brønner det er vekst i, slik at substratpreferanser kan identifiseres. Totalt kan G bruke hele 59 av 95 karbonsubstrat, mens A, B, E og F kan bruke hhv. 43, 47, 58 og 40. E og G kan dermed generelt vokse på flere substrat innen hver gruppe enn de andre kulturene, mens F kan dyrkes på færrest. Fordelt på de ulike substratgrupper som i figur 3.9 kan de fleste kulturene vokse på alle gruppene bortsett fra en, mens E kan vokse på alle. Alle kulturene kan nyttiggjøre en eller flere karbohydrater, karboksylsyrer, brominerte kjemikalier, aminosyrer, aminer og alkoholer. Derimot er det kun E og G som vokser på fosforylerte kjemikalier. B vokser ikke på noen aromater, A vokser ikke på noen amider, og G kan ikke vokse på noen av esterene.



Figur 3.9, viser prosentandel substrat innen hver kjemiske gruppe de ulike renkulturene kan nyttiggjøre i forhold til det totale antallet i hver gruppe på GN2™ BIOLOG mikroplater. Kurven er antall substrat innen hver gruppe.

3.2.2 Molekylær karakterisering

Det ble ekstrahert DNA fra renkulturene A-G voksende på 1% såpe, og forsøkt også med H på 0,5% og 0,125%. Figur 3.10 viser et fotografi av agarose gel med tydelige bånd av DNA og PCR produkter, DNA fra A, da denne ble gjort før de andre kulturene, og ingen resultater i form av DNA på gel kan vises for de andre kulturene, og PCR produkt fra A, B og E, da F, G og H måtte fortynnes og kjøres på nytt, resultater for disse er ikke vist. I tillegg vises rensede PCR produkter fra alle kulturene, det ble utført med to såpekonsentrasjoner av H, men kun den ene ble det resultat av. Tabell 3.5 viser sammendrag av resultatene for de ulike kulturene etter sekvensering og søk i BLAST. Noen kulturer fikk treff på 100% likhet som ikke stemte med resultater fra BIOLOG, men generelt er det *Pseudomonas* arter og *P. fluorescens* stammer som går igjen i alle kulturene, og siden det også gikk igjen i resultatene fra BIOLOG er kun denne slekten tatt med i resultatene fra sekvensering. I motsetning til BIOLOG var det ved sekvensering flere arter innen *Pseudomonas* slekten som hadde likhet med de sekvenserte kulturene og ikke bare *P. fluorescens*.



Figur 3.10, viser fotografi av agarose gel, venstre DNA produkt, midten PCR produkt og høyre rensset PCR produkt. Øverst kan konturene av brønner ses. L = Ladder, de andre renkulturer.

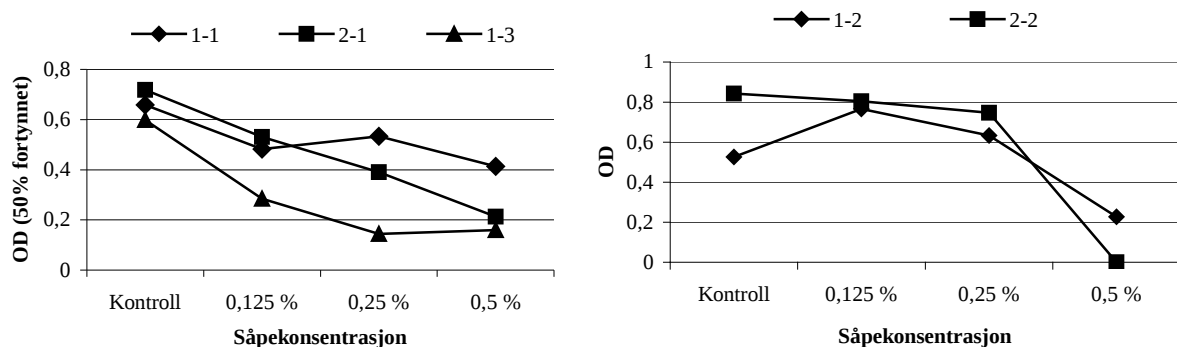
63

3.3 Effekt av Remikraft 703 på bakterier

3.3.1 Vekstegenskaper

3.3.1.1 Optisk celletetthet

Figur 3.11 viser sammenhengen mellom såpekonsentrasjonene og vekst i form av cellemasse målt i absorbans (OD). For sedimenteringskammeret ser det ut til at vekst hemmes ved høyere såpekonsentrasjon, men prøve 1-1 ved 0,25% er ikke i tråd med resten, det er heller ikke prøve 1-3 0,5%. Ser man på hovedbassenget er det også korrelasjon mellom vekst og såpekonsentrasjoner, men for 2-2 kunne nok korrelasjonen vært tydeligere dersom kontrollen, 0,125 % og 0,25 % hadde blitt fortynnet 1:1 slik som prøvene for sedimenteringskammeret ble. 0,5 % i samme prøven var uten vekst, noe som kan være en feil ved inokulering av kultur, Kontrollen til 1-2 har dårligere vekst enn forventet, noe som også kan komme av feil i overføring av kulturer. Alt i alt er veksten i anrikningskulturene kraftigere i kulturer uten såpe, og svakere jo mer såpe som tilsettes mediet. Det er også bedre vekst i kulturene fra sedimenteringskammeret enn hovedbassenget, da de trengte fortynning.



Figur 3.11, viser optisk tetthet i form av målt absorbans i kulturer på medie med ulike såpekonsentrasjoner. Venstre: viser kulturer fra sedimenteringskammeret, venstre: hovedbassenget.

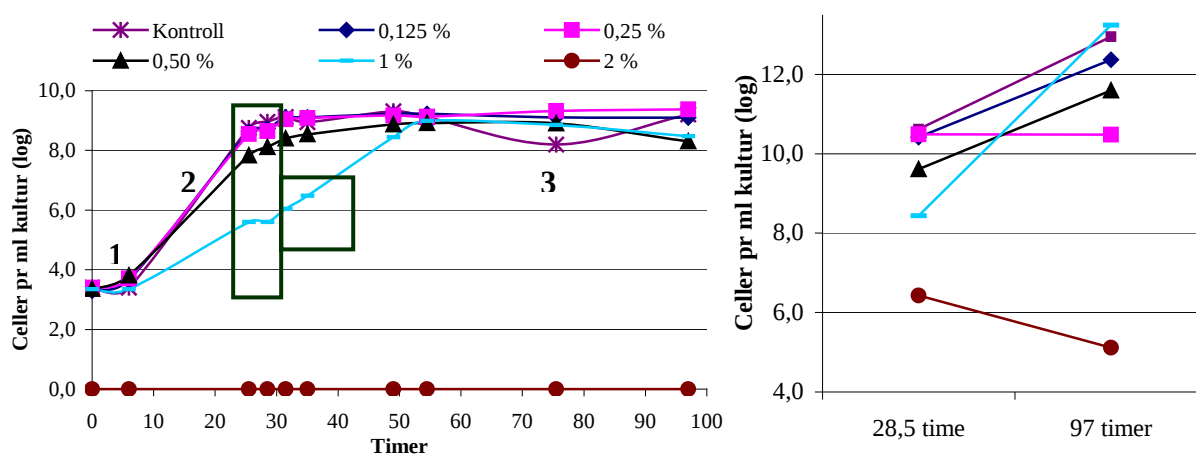
3.3.1.2 Generasjonstid og vekstkurve

Renkultur

Flere av uttakene ble ikke fortynnet nok, da særlig kulturen på 1 % visuelt så ut til å være uten vekst ved de første uttakene, og der hvor skålene er overgrodd (markerte felt) ble antallet estimert ved å sette antallet på den høyeste fortynningen til 250 kolonier, da overgrodd betyr at det er over 250, og her var det mye over (egentlig antall estimert til å være ~5-600

kolonier). Etter 6 og 28,5 time ble det ikke tatt uttak fra 1/100 og 1/50, så disse tallene er satt til samme verdi som forrige uttak, da det var beste løsning da det var i vekstfasen, også disse er markert i figuren.

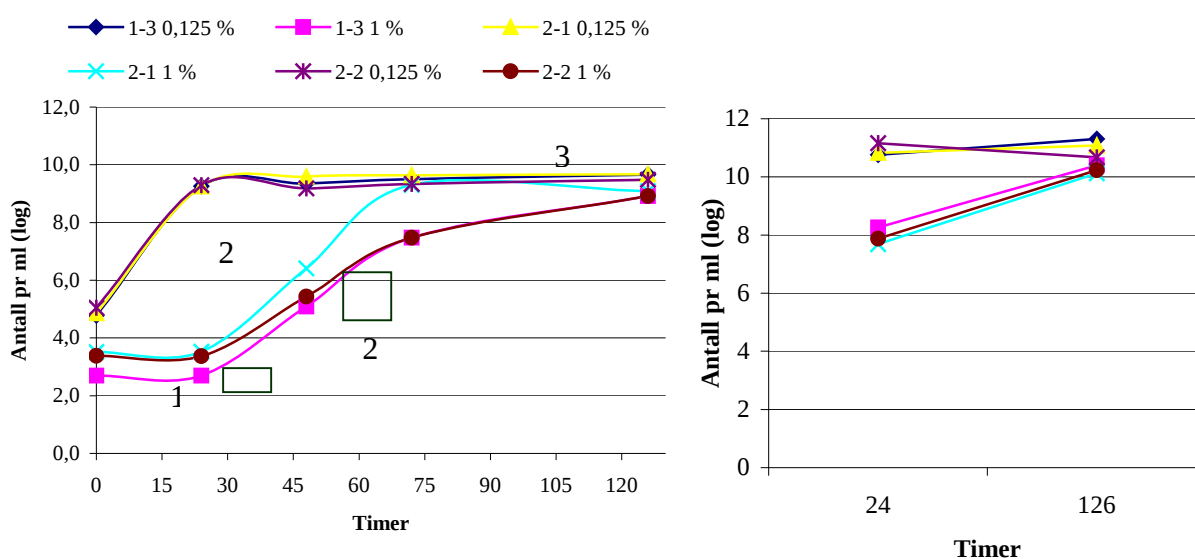
Figur 3.12 viser at vekstkurven for renkultur F er stort sett den samme for de fleste såpekonsentrasjonene og kontrollen, men ved 1 % er vekstfasen nesten fordoblet (54,5 time i forhold til 28,5 time), og ved 2 % er det ingen overlevelse av bakteriene, ikke en gang ved start. Vekstfasen til kontrollen, 0,125 % og 0,25 % såpe er ca. fra time 6 til 25,5, mens den hos 0,5 % er ca. fra time 6 til 28,5, og ca. fra time 6 til 54,5 hos 1 %. Generasjonstiden er ut fra dette beregnet til ca. 1t 6 min, 1t 12 min, 1t 15 min, 1t 30 min og 2t 40 min for hhv. kontroll, 0,125, 0, 25, 0,5 og 1 % såpe, den øker med økende såpekonsentrasjon og 1 % er mye lengre enn de andre. Det er kun i 1 % kulturen hvor veksten er hemmet betydelig i forhold til kontrollen, men også 0,5 % vokser litt saktere enn kontrollen og de andre hele veien, og synker til sist. Kulturen på 1 % ligger etter vekstfasen på samme antall som de øvrige (bortsett fra 0,5 % som er under), men synker likt med 0,5 % ved siste uttak. Startkonsentrasjonen er den samme i alle kulturene så variasjoner i vekst mellom kulturene er kun pga. såpen. Totaltallet ligger litt over det dyrkbare antallet hele veien, men 2 % i motsetning til de andre synker etter 97 timer.



Figur 3.12, venstre: veksten til F i rystekulturer med ulike såpekonsentrasjoner (gitt i prosent). Veksten ble fulgt i 97 timer og er gitt som antall celler pr ml kultur til enhver tid. Markerte felt viser målinger hvor fortynningene var for høye eller ikke utført og tallene er estimat satt til hhv. minimum- antall i kulturene eller samme antall som ved siste uttak. 1 = lag fase, 2 = eksponentiell vekstfase, 3 = stasjonær fase. Høyre: viser totaltall som ble målt i samme kolber og uttak som CFU ved to anledninger.

Anrikningskulturer

Det var nok mye mer enn 10^6 pr ml i de opprinnelige kulturene, så startkonsentrasjonen var for høy, bortsett fra i 1%, og dermed ble ikke fortynningene helt riktige det første uttaket og skålene ble overgrodd, dvs. over 250 kolonier pr skål. Likevel var det mulig å telle alle koloniene, så disse resultatene er med, men siden vekstforholdene kan ha vært dårlige pga for høy konsentrasjon av celler kan det egentlige antallet ha vært høyere og antallet er noe usikkert. Ved 48t ble det kun tatt fra 0,125% kulturene, ved 72t kun fra 1%. De uttakene som manglet ble estimert ved å ta gjennomsnitt av uttaket før og etter da det så ut til å passe best med kurvene, se figur 3.13.



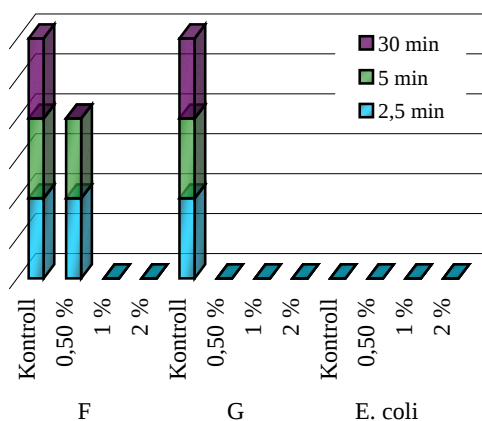
Figur 3.13, venstre: veksten til tre anrikningskulturer på to såpekonsentrasjoner (%). Veksten ble fulgt i 126 timer og er gitt som antall celler pr ml kultur til enhver tid. Markerte felt viser målinger hvor fortynningene var for lave og tallene kun er estimat. 1 = lag fase, 2 = eksponentiell vekstfase, 3 = stasjonær fase. Høyre: totaltall som ble målt i samme kolber ved to anledninger.

Kulturene på 0,125 % har kortere lagfase enn de på 1 %, og da det ikke ble gjort uttak før etter 24 timer ble det ikke mulig å skille lagfasen og vekstfasen hos disse. Kulturene på 1 % trenger derimot lengre tilvenning og har en lagfase på ca. 24 timer og deretter en vekstfase på ca 48 timer etter tilvenning hos 2-1, hos 1-3 og 2-2 er den vanskelig å definere, høyest vekst skjer fra 24-72 timer fra start, men det fortsetter å vokse svakt også etter 72 timer. Ellers ser man at 1% kulturene vokste opp saktere, men nådde til slutt omtrent samme konsentrasjon som 0,125%. Generasjonstiden i vekstfasen er beregnet til $\sim 1t\ 40\ min$ for 1-3 og 2-1 og $1t\ 50\ min$ for 2-2 på 0,125 % såpe (mellom 0 og 24 timer fra start), og $\sim 3t, 2,5t$ og $3,5t$ for hhv. 1-3, 2-1 og 2-2 på 1 % såpe (mellom 24 og 72 timer fra start), dvs. den er dobbelt så lang for

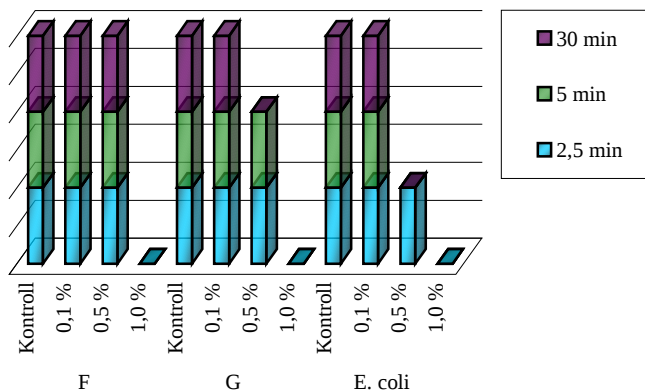
høyere såpekonsentrasjon. Totaltallet ligger litt over hele veien, og alle har økt fra 24 til 126 timer bortsett fra 2-2 1%.

3.3.2 Toleranse for såpen ved ulike konsentrasjoner

Når såpen er blandet i vann har den giftig for renkultur F først etter 30 min. i 0,5 % og renkultur G tåler ikke selv den laveste konsentrasjonen 0,5 % (figur 3.14). *E. coli* vokste ikke i kontrollen i det første forsøket, men neste forsøk viser litt andre resultater for alle renkulturene (figur 3.15). Fremdeles er 0,5% såpe er maksimum tålegrense for bakteriene, denne gangen overlevde F også etter 30 min., og bakteriene døde ikke før de ble utsatt for 1% såpe. G som i første forsøk ikke tålte noe oppholdstid i 0,5 % såpe overlevde denne gangen i 5 minutter, men ikke etter 30 minutter, det gjorde den derimot i 0,1 %. *E. coli* overlevde også 30 minutter med 0,1%, og 2,5 minutt i 0,5%, etter så kort som 5 minutter døde bakteriene. Ved å blande såpe i R2A og KPG medium i stedet for vann kunne alle tre kulturene overleve i 30 minutter i 1 % såpe.

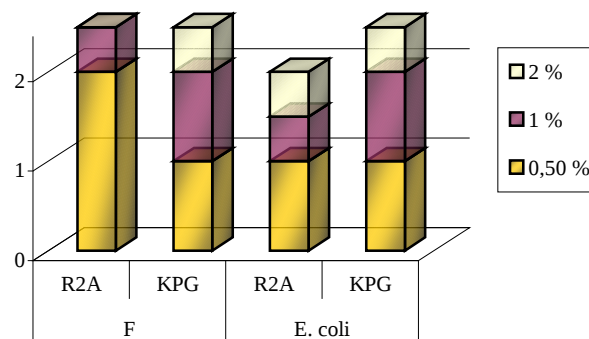


Figur 3.14, første forsøk med såpe i vann hvor stolpene angir i hvilke såpekonsentrasjoner og ved hvilke eksponeringstider bakteriene overlevde.



Figur 3.15, andre forsøk med såpe i vann hvor stolpene angir i hvilke såpekonsentrasjoner og ved hvilke eksponeringstider bakteriene overlevde.

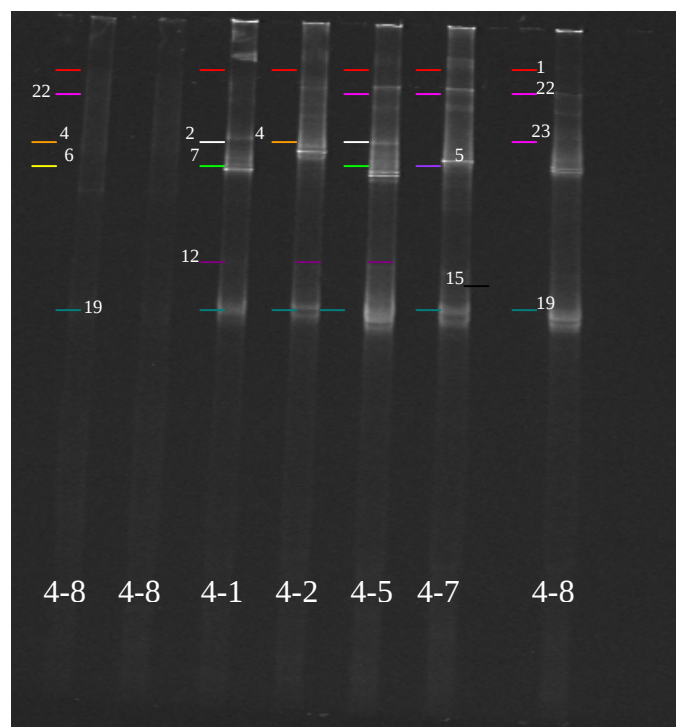
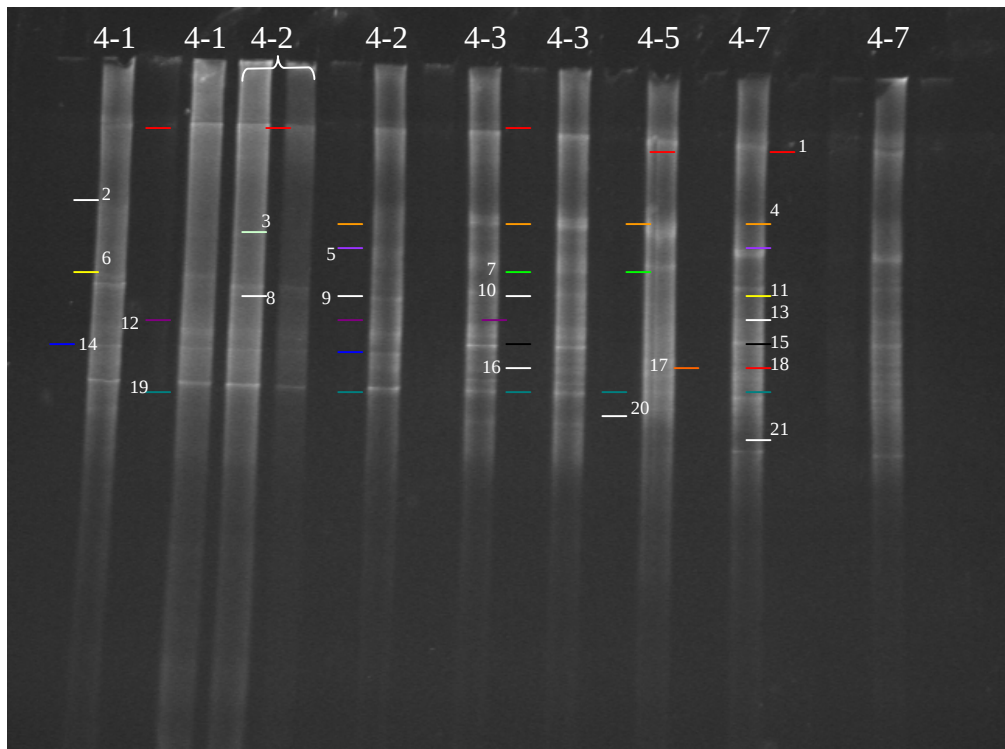
F, G og *E. coli* ble inokulert til R2A og KPG medium med såpekonsentrasjoner 0,5 %, 1 % og 2 % og resultatene etter 7 døgn vises i figur 3.16. F vokser i 2 % såpe i KPG, men vokser kun i opptil 1% når den er i R2A, i motsetning til *E. coli* som viser seg å tåle også 2 % såpe i begge medier, selv om veksten er kraftigst i KPG. Figuren viser også hvor mye vekst det var i de ulike kulturene, satt til 2 for mye vekst, 1 for god vekst og 0,5 for noe vekst. *E. coli* har dårligere vekst i R2A enn i KPG, mens F har bedre vekst i R2A men tåler såpen bedre i KPG. *E. coli* har vært innkubert uten risting, dvs. forholdene har vært tilnærmet om ikke helt anaerobe, og veksten har dermed skjedd via fermentering.



Figur 3.16, viser vekst etter 7 dager hos kulturene F og *E. coli* i R2A og KPG medium med ulike såpekonsentrasjoner. Vekst er målt som 0,5 = noe vekst, 1 = god vekst og 2 = mye vekst.

3.3.3 Endringer i artssammensetning

Figur 3.17 viser fotografier av DGGE gelene med alle prøvene og kulturene. Da kvaliteten ikke er like god som på papir-foto er det vanskelig å se alle båndene, og i tillegg er ikke eksponeringen lys nok til at bånd kommer godt frem, men båndene er merket av i forhold til det som er observert med bedre kvalitet. Det er tydelig færre bånd og dermed også antatt færre arter i kulturene dyrket på såpe enn i prøvene de er isolert fra, og andelen felles bånd er fra 44,5-66,7 % som vist i tabell 3.6. Dermed finnes det flere arter i kulturene som ikke avgir bånd i prøvene. Når man tar en vann-/sedimentprøve og dyrker den på medium med såpe (1 %) synker antall bånd med opptil 80 % og artssammensetningen (dominerende arter) endres, slik at arter som er i ubetydelige antall i miljøet kan vokse opp og overta for de som er dominerende.



Figur 3.17, sammenligning av båndene i vann- og sedimentprøver (øverst) og i kulturene (nederst). De to parallellene av vannprøve 4-8 er til venstre i nederste bilde. Bånd som kan være de samme er i samme farge og på samme høyde i gelen og nummerert. Båndene er ikke merket av nøyaktig på båndet da det ikke var mulig å plassere linjer så tett, og båndene er funnet ved å se på et fotografi av gelene med noe høyere eksponering, slik at alle bånd ikke vil være synlige på disse bildene. For vannprøvene er det to brønner (tre for 4-2) pga. filteret som ble delt i to, så like bånd i de to parallellene er derfor kun merket som ett.

Til sammen er det 22 ulike bånd i de fem prøvene hvorav 8 bånd finnes i mer enn én prøve, og i kulturene er det til sammen 10 ulike, hvorav 6 finnes i to eller flere kulturer. Av de 10 båndene i kulturene finnes 9 av disse i en eller annen prøve, ikke nødvendigvis den som hører til, dvs. 1 bånd finnes ikke i noen prøver. Skullerud og SK ved barriere (4-2) har det høyeste antallet bånd i vannet, mens Taraldrud har det laveste. Hovedbassenget har høyt antall bånd, faktisk flere enn sedimenteringskammeret ved innløpet og sedimentet har lavt antall i forhold til vannprøvene.

Tabell 3.6, oversikt over antall bånd i de ulike prøvene og kulturene og andelen som er felles i de. Andelen felles gis også som prosent av antallet i prøvene. I siste kolonne vises også prosentandelen bånd i hver kultur som ikke finnes i prøven.

Prøve/kultur	Prøve	Kultur	Antall felles	Kun kultur
4-1	6	5	4 66,7 %	20 %
4-2	9	4	4 44,5 %	0 %
4-3	8	-	-	-
4-5	6	6	3 50,0 %	50 %
4-7	9	5	4 44,5 %	20 %
4-8	5	4	3 60,0 %	25 %
Alle	22	10	9	
Finnes i ≥ 2	8	6		

3.3.4 Vekst på næringsfattig medium

Renkulturer

Etter to overføringer til R2A1 medium med såpe ble det observert vekst i renkulturene E og F etter 10 dager. Kontrollene var blakket men ikke med mye vekst, og både E og F 1% og 0,125% var veldig svakt blakket, F 0,125% litt mer enn de andre. På R2A2 etter 7 dager var alle kolbene litt blakket. Ved mikroskopering kan kun én celle observeres, noe som betyr $\geq 10^6$ celler pr ml. Etter ytterligere to dager blir noen kulturer mikroskopert igjen, i F kontroll ses mange veldig små bakterier, i de andre ses kun en eller et par celler. Når kulturene ble fortynnet og spredt på agar var samtlige etter syv dager overgrodd. I forhold til fortynningene kan minimum antall bakterier estimeres, ved at antallet kunne telles til å være over 500, og dermed sette antallet kolonier pr skål til > 500 på den høyeste fortynningen. På noen av skålene kunne antallet telles, men likevel vil det egentlige antallet være høyere da vekstforholdene ikke er optimale når det er for mange bakterier til stede. Fra disse estimatene ser man da at antallet bakterier pr ml kultur var $> 5 \cdot 10^5$ i alle kulturene med såpe, $> 5 \cdot 10^6$ i R2A1 F kontroll, og $> 5 \cdot 10^7$ i resten av kontrollene. I forhold til opprinnelig inokulert mengde (1 ml kultur i 20 ml medie) har det vært noe vekst i kulturene.

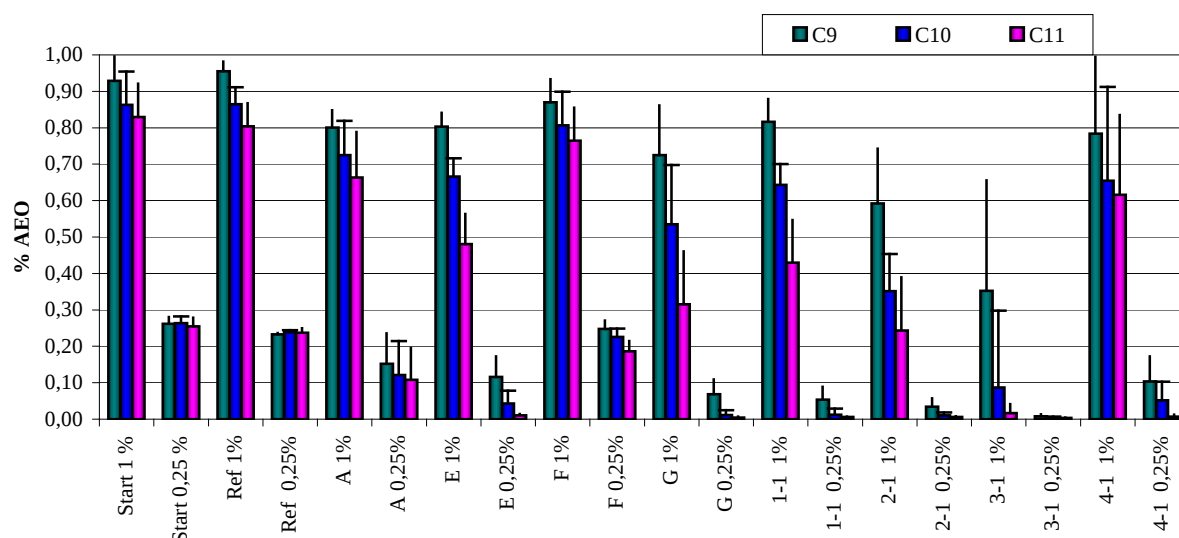
3.3.4.2 Anrikningskulturer

Etter innkubering på risting i ni dager ble kulturene visuelt undersøkt for vekst i form av blakking av mediet. Ingen av kulturene hadde god vekst, men i de fleste var det tydelig fargeendring og mediet var blakket. Unntakene var 4-8 som kun var noe blakket i begge konsentrasjonene av såpe og i kontrollen. I tillegg var også 1% kulturene av 1-1, 1-3, 2-1 og 3-1 muligens litt svakere blakket enn de andre, 1-2 var helt klart svakere, og i 2-2, 3-2 og 4-3 var det ingen tegn på vekst i hele tatt. De siste fire er alle fra hovedbassenget.

3.3.5 Nedbrytning av komponenter i såpen (Remikraft 703)

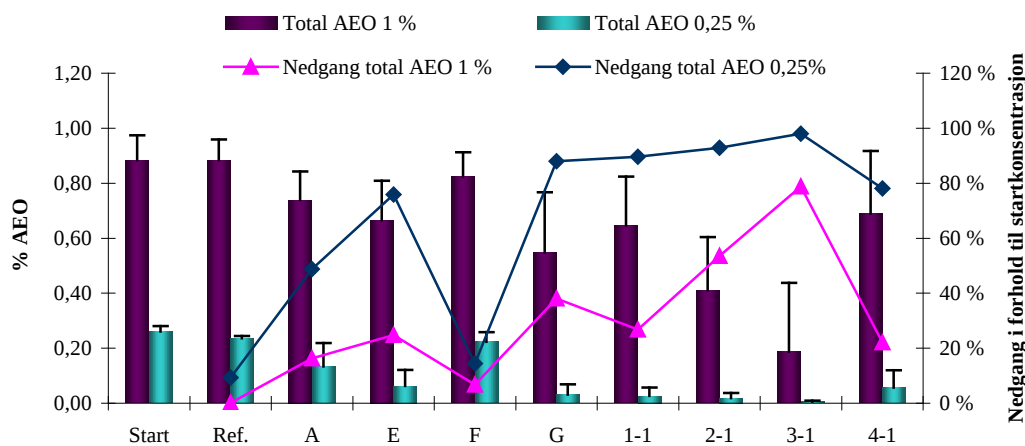
Etter å ha blitt dyrket i 14 dager var de fleste kulturene på begge såpekonsentrasjoner relativt klare og så ut som de hadde lite vekst. Renkulturer E, F og G hadde endret farge noe (blitt gulere) men var veldig tynne. Anrikningskulturen 3-1 0,25 % var det god vekst i, samme med 4-1 begge konsentrasjoner.

Bakgrunnsprøven med kun medium viste ingen verdier for noen AEO, og er dermed er de målte verdiene i prøvene og referansene korrekte og uten bakgrunnsstøy. Mengden AEO i prøvene er kvantifisert relativt mot innholdet av AEO i såpen, men da denne er ukjent (1-5 %) er prøveresultatene gitt som AEO i % i forhold til mengden i såpen, dvs. en prøve med 1 % såpe vil innholde 1 % AEO i forhold til mengden i ren såpe. Startkonsentrasjonene i kulturene ved dag 0 var relativt like og dermed brukes bare gjennomsnittet av de to (F og 4-1) for hver såpekonsentrasjon. Verdiene var hhv. 0,884 % og 0,261 % for 1 % og 0,25 % prøver. Referansene hvor medium tilsatt såpe i høy (1 %) og lav (0,25 %) konsentrasjon var innenfor standardavvikene til startkonsentrasjonene og dermed har ikke nedbrytning foregått uten mikroorganismer. Figur 3.18 viser mengde av hver AEO gruppe (C9-11) i hver prøve gitt som gjennomsnitt av alle etoksileringene innen hver gruppe. Start 0,25 % har omtrent lik mengde C9, C10 og C11, i motsetning til start 1 % hvor det er mest C9 og minst C11, men det er variasjon i etoksileringene hos start 1 % slik at forskjellene kan være ubetydelige. Det er nedgang i mengde AEO i alle prøvene, mest i anrikningskulturene, og nedgangen er stort sett lik for C9, C10 og C11. Standardavvikene viser at variasjonen innen etoksileringene kan være høy.



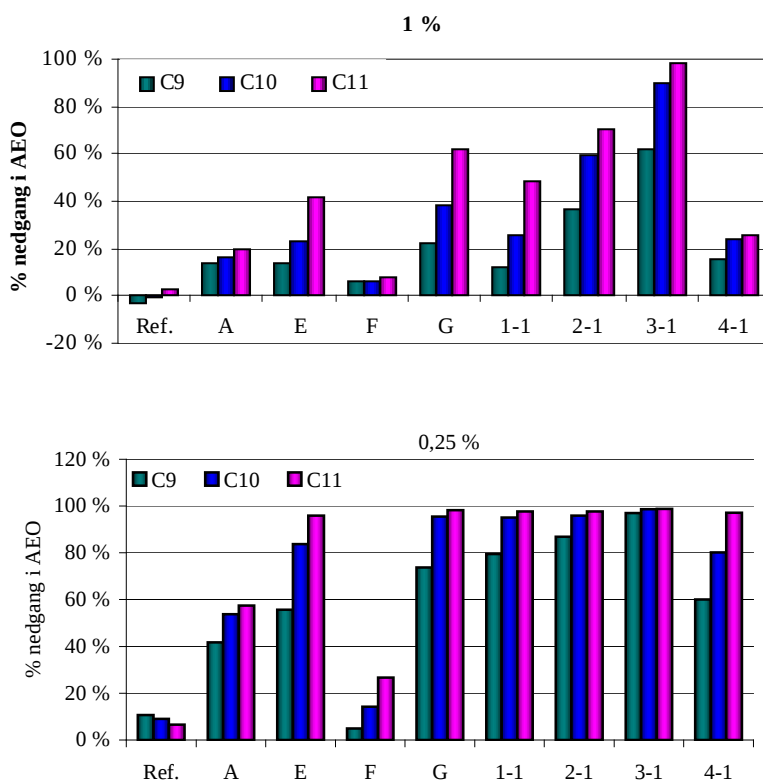
Figur 3.18, mengde gjenværende AEO etter 14 dager, med standardavvik for variasjoner innen EO for hver av C9, C10 og C11. Prosentandelen såpe i mediet er angitt for hver prøve.

Mengde total AEO som gjennomsnitt av EO og C9-11 vises i figur 3.19 sammen med prosentvis nedgang av totale AEO i hver prøvene i forhold til startkonsentrasjonene. Mest nedbrytning har funnet sted i 0,25 % prøvene, og mest i 3-1 i begge konsentrasjonene. Nedbrytningsraten til kulturene er fra 6,73 (F) til 97,97 % (3-1), et vidt spenn, men gjennomsnittet for 0,25 % prøvene er 66,10 % mens det for 1 % prøvene er 29,67, omtrent det dobbelte. Det er tydelig høyere nedbrytning hos anrikningskulturene enn renkulturene, gjennomsnittet er hhv. 45,28 og 89,62 % for 1 % og 0,25 % i forhold til 21,46 og 79,45 % for renkulturene i hhv. 1 % og 0,25 % såpe. Også her er forskjellen mellom de to såpekonsentrasjonene tydelig, hvor det er vesentlig høyere nedbrytning i 0,25 %.



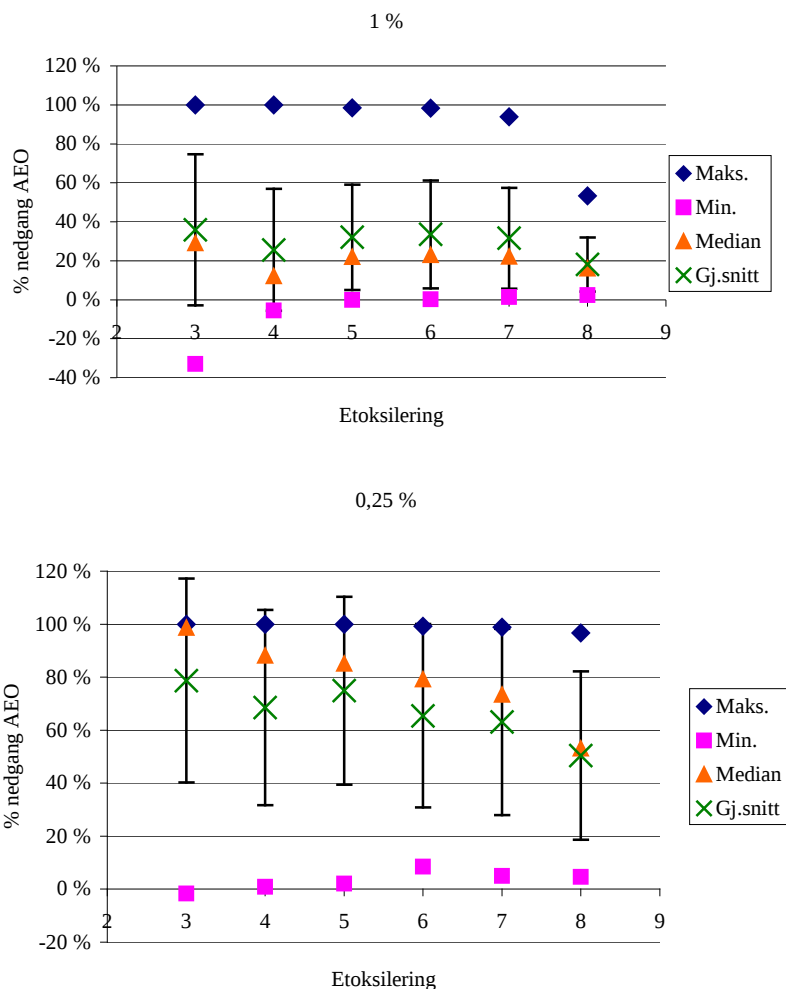
Figur 3.19, gjenværende AEO i prøvene gitt som % av AEO i såpen, gjennomsnitt av alle C og EO med standardavvik for variasjoner mellom C9, C10 og C11. Prosentvis nedgang i total AEO over 14 dager angis for hver prøve og referansen.

Figur 3.20 viser prosentvis nedgang i de tre AEO gruppene i forhold til hver gruppes startkonsentrasjon, og det er minst nedbrytning av C9 i samtlige prøver, mest av C11. C9 i referansen har økt i forhold til starten, men som tidligere vist er referansen innenfor standardavviket til startkonsentrasjonene, slik at de negative verdiene er ubetydelige. I F har det foregått minst nedbrytning av AEO, og her er det lite eller ingen forskjell mellom gruppene.



Figur 3.20, viser prosentvis nedgang i total AEO som gjennomsnitt av alle EO for de ulike kulturene på begge konsentrasjoner såpe.

Lengde på etoksileringene på karbonkjeden har lite eller ingen effekt på nedbrytningen i dette forsøket. Gjennomsnittet av alle prøvene med alle tre AEO grupper for hver etoksilering er relativt usikre verdier med store avvik som vist i figur 3.21. Høyeste og laveste verdi samt median er også gitt for datasettene, som består av prosentvis nedbrytning hos alle tre C9-11 og alle kulturene for hver EO. Generelt er det stor spredning mellom prøvene og AEO gruppene, men variasjonen er noe mindre hos EO8, spesielt på 1 % såpe. Gjennomsnittet er lavere hos EO8 i begge såpekonsentrasjonene, men for de andre EO er det ingen korrelasjon mellom verdi og nedbrytningsrate.



Figur 3.21, viser maksimum verdier for prosentvis nedgang i AEO fordelt på EO 3-8 som gjennomsnitt av alle prøvene og lengde på karbonkjedene (9-11). I tillegg vises median og gjennomsnitt med standardavvik for verdiene fordelt på EO.

3.4 Dyrkning på olje, diesel og PAH

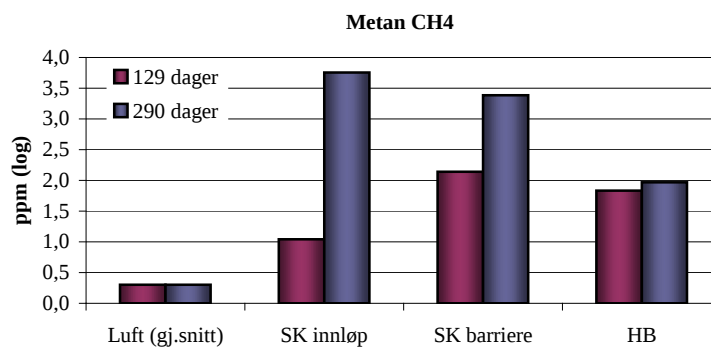
Vekst i kulturene ble observert visuelt og ved mikroskopering etter 14 dager for olje og diesel og 13 dager for fenantren, og det ble observert visuelt etter hhv. 42 og 41 dager. Tabell 3.6 viser oversikt over vekst i kulturene ved siste observasjon. Det kommer fram at kontrollen har dårligst vekst i samtlige kulturer, noen ganger er fenantren også like dårlig men kan også være litt bedre. Olje og diesel er det størst vekst i av samtlige, og olje har ofte mest. For det meste er det best vekst i anrikningskulturene i forhold til renkulturene, men det er ingen klar forskjell mellom sediment og vannprøver. Det er heller ingen sammenheng mellom renkulturene og anrikningskulturer fra samme prøvested. Alt i alt ser man at bortsett fra B klarer alle prøvene å vokse godt på olje og diesel, mest på olje, dårligst på fenantren.

Tabell 3.8, vekst i kulturer dyrket på olje, diesel (42 dager) og fenantren (41 dager) samt kontrollene. Ingenting = -, Lite/noe = +, Blakket = ++, En del = +++, Masse vekst = +++++

Kultur	Forurensning	Vekst
A (1-1)	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++ ++ + +
B (2-1)	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+ + + +
E (4-1)	Olje Diesel Fenantren Kontroll	++++ ++++ + +
F (4-5)	Olje Diesel Fenantren Kontroll	++ +/ ++ + -/+
G (4-7)	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++++ + + -/+
1-1	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++++ ++ + ++
1-3	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++++ +++++ + +
2-1	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++/ +++++ +++ ++ +
3-1	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++++ +++++ ++ ++
3-5	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++++ ++ + +
4-1	Olje Diesel Fenantren Kontroll	++ ++/ +++++ ++/ ++
4-5	Olje Diesel Fenantren Kontroll	+++++ +++ ++ +

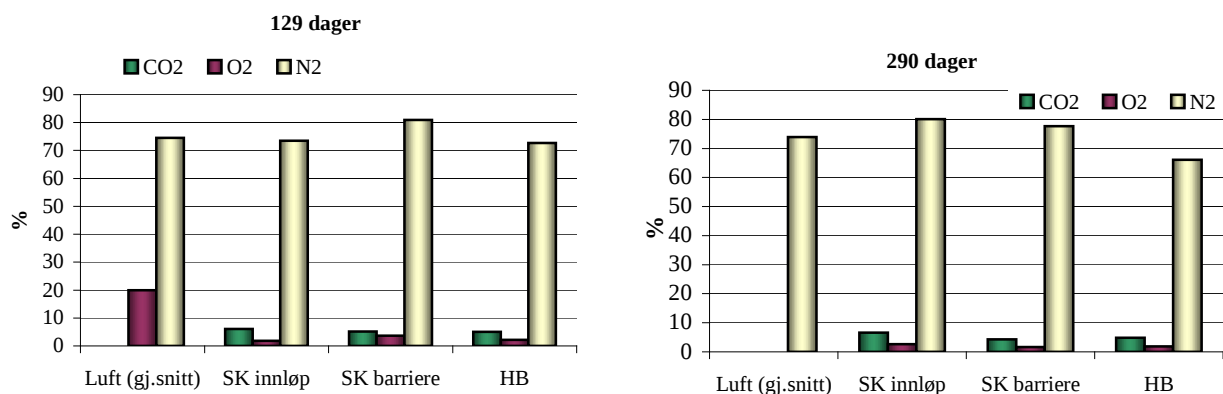
3.5 Gassanalyser av sediment

Gassanalysene viste høy metandannelse i sedimentene, etter 129 dager hadde prøven fra sedimenteringskammeret (SK) ved barriere (3-4) produsert mest, men etter til sammen 290 dager var det SK ved innløpet (3-3) som hadde høyest mengde, se figur 3.22. Prøven fra hovedbassenget (3-5) hadde etter 290 dager minst metandannelse. Metanproduksjonen i 3-3 tok lengre tid enn de andre prøvene, men økningen fra dag 129 til 290 var størst i denne, over tredoblet.



Figur 3.22, metandannelse i sedimentene etter 129 og 290 dager gitt som ppm i forhold til standard for luft (2 ppm) og referansen (luft, fra korridoren).

Fra analysene ble det også beregnet andel CO₂, O₂ og N₂, og figur 3.23 viser mengden av hver gass i prosent. Sedimentene hadde i løpet av 129 dager brukt opp det meste av O₂, N₂ økte noe i sedimenteringskammeret etter 290 dager, mens CO₂ hadde økt maks. 7 %. Etter 290 dager var det lite O₂ igjen i alle prøvene.



Figur 3.23, gass i flaskene med sediment etter 129 og 290 dager.

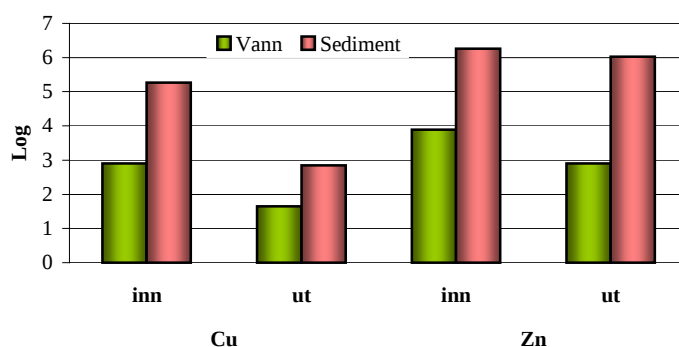
4. Diskusjon

4.1 Isolering og dyrking av bakterier

4.1.1 Bestemmelse av antall dyrkbare og totalantall bakterier

Det dyrkbare antallet bakterier i vannet i dammene er fra rundt 10^5 - 10^6 pr ml, totaltallet i prøve 4 er fra 10^6 - 10^7 pr ml. Sedimentene har dyrkbart antall fra 10^6 - 10^7 pr ml mens totaltallet er på 10^7 - 10^9 , noe som er vanlig for sediment, de vil ofte inneholde store mengder organisk materiale og har god tilgjengelighet på oksygen og kan dermed ha vesentlig høyere antall bakterier enn antallet som befinner seg løst i vannfasen.

Det er flere bakterier pr ml i sedimenteringskammeret i forhold til hovedbassenget med unntak av prøve 2, hvor hovedbassenget har høyere antall enn sedimenteringskammeret av ukjent årsak. Disse resultatene er som forventet, sedimenteringskammeret vil inneholde en større andel bakterier fra tunnel- og veivask, og disse vil forbli i sedimenteringskammeret. Prøve 4 hadde svært lite bakterier i hovedbassengvannet i forhold til sedimenteringskammeret, noe som kan ha vært pga. den store mengden alger som fantes i bassenget da disse kan ha oppblomstret på bekostning av dyrkbare bakterier. En annen mulig årsak er at bakterier fra hovedbassenget ser ut til å vokse dårligere ved lavere temperaturer enn 20°C , slik at dyrking ved 15°C kan ha gitt et lavere tall. Innløpsvannet til sedimenteringskammeret inneholder en stor del mer av bl.a. Cu og Zn enn utløpsvannet fra hovedbassenget (figur 4.1, (Meland et al. 2007)), og generelt er innløpsvannet betydelig mer giftig enn utløpsvannet, så det ser ut til at bakteriene som befinner seg i dammen er motstandsdyktige ovenfor stoffene i veiavrenningen og tunnelvask, eller at stoffene befinner seg i en form eller konsentrasjon som ikke er giftig for bakteriene.



Figur 4.1, gjennomsnittlige konsentrasjoner i vann (Meland et al. 2007) og sediment (Leistad 2007) i Vassum angitt som hhv. $\mu\text{g/L}$ og $\mu\text{g/kg}$ våtvekt. Inn og ut for vannprøvene er innløpsvann samlet før det havner i dammen og utløpsvann. I sediment, inn = sediment i SK mens ut er HB ved utløpet.

Sedimenteringskammeret inneholder også større mengder bl.a. Cu og Zn i sedimentet enn hovedbassenget (figur 4.1, (Leistad 2007), noe som betyr at mye av metallene har endt opp i sedimentene, og bakteriene tolererer dette.

Det er noe færre bakterier som vokser på næringsrik KPG enn på mer næringsfattig R2A, noe som kan bety at det er flere K-strateger i dammen som best nyttiggjør seg lave mengder næringsstoffer, slik at de dominerer også på næringsfattig agar. Bakterier i prøve 1 og 2 bruker litt lengre tid på å vokse opp jo lavere temperaturen er (5-10 dager) men de har alle nådd toppen etter ca 10 dager. Prøve 3 viser større spredning, noen når ikke maks. antall før opptil 28 dager og det er ikke like stor sammenheng mellom hurtig vekst og temperatur. Det totale antallet bakterier øker når temperaturen øker, bortsett fra SK 20°C, hvor verdien fra prøve 1 er lavere enn resten, og mest sannsynlig er denne en feil. Ser man bort i fra denne er det tydelig at lavere temperaturer hindrer oppformeringen av fullstendig antall bakterier som finnes i prøvene, og at blant disse temperaturene er 20°C det optimale, de andre temperaturene hemmer veksten av noen bakterier i prøvene. Spesielt prøvene fra hovedbassenget vokser dårligst ved lavere temperaturer og har større forskjeller mellom temperaturene. Noen bakterier kan kun vokse under 15°C (psykrofile) mens andre er avhengig av temperaturer over 20°C. Psykrotrofe bakterier, f.eks. *Pseudomonas fluorescens* vokser best mellom 20 og 30°C, men kan også vokse ved 0-7°C.

Såpene til tunnelvask er svært giftige for mikroorganismer i vann før komponentene er brutt ned (Roseth & Amundsen 2006). For Remikraft 703 er EC₅₀ (*Daphnia*) for de ulike stoffene > 100 µg/ml, 1-10 µg/ml og 10-20 µg/ml for hhv. Natriummetasilikat, AEO og QAC, og LC₅₀ 100 µg/ml for NTA (*Daphnia*) (HMS Datablad 2006). NTA har på *Pseudomonas fluorescens* og *Pseudomonas putida* hhv. EC₅₀ og NOEC på 3200-5600 µg/ml og 10.000 µg/ml. Den baktericide stoffgruppen QAC har blitt observert å ha EC₅₀ (metabolsk aktivitet hos *Photobacterium phosphoreum* etter 30 min eksponering ved 15°C) så lavt som 0,15-0,63 µg/ml varierende for ulike typer QAC, mens stoffet i Remikraft 703 skal ha EC₅₀ for nitrifikasjonsbakterie ved 1800 µg/ml (HMS Datablad 2006; Garcia et al. 2001; Magnus 1996). 1 % såpe tilsvarer 100-500 µg/ml av hver komponent i såpen, slik at toksisiteten skal være høy for *Daphnia* men lav eller usikker for bakterier. Ulike såpekonsentrasjoner i agaren resulterte i at koloniene vokste saktere opp, jo høyere konsentrasjon jo lengre tid brukte koloniene på å nå totalt antall. Antallet er derimot høyere på agar med såpe enn uten i noen

prøver, noe som betyr at såpen ikke hemmer vekst, bare forsinker den, i motsetning til temperaturen, som reduserer vekst av noen bakterier hele veien. Ettersom det ikke er trolig at såpen fremmer vekst av bakterier når den er tilstede i dette mediet, kan man ikke konkludere med at det er noen korrelasjon mellom antallet bakterier på skålene og såpeinnholdet i agaren. Siden samme agar er benyttet og bakteriene tidligere har syntes å vokse bedre på dette (R2A) enn næringsrikt medium (KPG) er det lite trolig at såpen har bidratt til ekstra næring og vekst i dette tilfellet.

Antallet bakterier i de fire prøvene er i forholdet prøve 2 > 3 > 4 > 1. Dette stemmer med tidspunkt for prøvetakingen, da prøve 1 var etter snøsmelt og noe nedbør, men ellers ingen større avrenningsepisoder, prøve 2 ble foretatt etter tunnelvask, prøve 3 ikke lenge etter tunnelvask samt rett etter en mindre nedbørsperiode, og prøve 4 ble tatt etter en lengre periode uten særlig nedbør eller andre avrenningsepisoder. Den dyrkbare andelen bakterier i miljøet generelt er estimert til å være kun 0,1-10 % av det totale antallet til stede, noe som reflekteres i disse resultatene hvor totaltallet er 3-300 ganger ($10^{0,5}$ - $10^{2,5}$) høyere enn CFU (uten såpe). CFU kan være unøyaktig da det ikke er garantert at hver koloni har oppstått fra én enkelt celle, og ved få kolonier på skålen kan dette gjøre betydelig utslag på resultatene, men det er en god indikator, og sammen med totaltall gir det et bilde på antallet i dammene. Totaltallet fra vannprøvene er stort sett likt i alle, noe som kan bety at det kun er det dyrkbare antallet som varierer, men sedimentet har høyest antall også ved totaltall, og forskjellen mellom totaltall og CFU er høyere i sedimentet, noe som kan sammenheng med at det kan finnes obligat anaerobe bakterier i sedimentet som observeres ved totaltall men som ikke dyrkes ved CFU. Å sammenligne antallet i de tre dammene er vanskelig da plasseringen for prøvetaking ikke er den samme i de tre i forhold til innløp og utløp, og totaltallet gir et annet resultat enn det dyrkbare antallet. Generelt ser det ut til at Skullerud og Taraldrud er relativt like mens Vassum ligger noe høyere, spesielt i antall dyrkbare bakterier.

Da det ikke ble observert dyrkbar vekst i usterilisert såpe, har ikke evt. bakterier fra såpen interferert med antallet dyrkbare bakterier fra prøve 4.

4.1.2 Isolering av bakteriekulturer dyrkbare på Remikraft 703

Det ble valgt ut betydelig flere kolonier for renkulturer enn det som var mulig å dyrke på 1 % såpe, noe som tyder på at evnen til å tolerere/nyttiggjøre såpen kun er hos et fåtall arter i

dammene. Fra prøve 3 var ingen av de utvalgte renkulturene dyrkbare på 1 % selv om denne prøven ikke var foretatt lenge etter tunnelvask, når såpe kan ha vært i bassengene. Derimot var renkulturer dyrkbare på såpe fra prøve 1 og 4, selv om disse ble foretatt lenge etter siste tunnelvask og det sannsynligvis ikke var såpe i dammene. Når det gjelder anrikningskulturene var det vanskeligere for kulturer fra prøve 3 og 4 å vokse på 1 % såpe enn det var for prøve 1 og 2, og de to som ikke vokste i hele tatt, selv etter gjentatte overføringer fra 0,125 % såpe, var fra hovedbassenget i begge prøvene. En mulig forklaring er at såpen er lett nedbrytbar (HMS Datablad 2006) og at den derfor kun finnes i sedimenteringskammeret i korte perioder etter tunnelvask, og bakterier i hovedbassenget vil ikke ha tilvent seg såpen. Men ettersom hovedbassengkulturene både fra prøve 1 og 2 vokste på 1 % såpe relativt raskt er dette imidlertid ikke noen sikker årsak til mangel på vekst, i tillegg ble det ikke observert noe lavere vekst i hovedbassenget på agar med såpe under CFU forsøk. Såpen vil være mer degradert ved prøve 1, 3 og 4 i forhold til prøve 2, men kulturer fra prøve 2 ser ikke ut til å dyrkes bedre på såpe enn de andre. Anrikningskulturene fra prøve 1 og 2 var ikke dyrkbare på såpekonsentrasjon 1,25 % og 2,5 % noe som tyder på at 1 % er tålegrensen.

4.2 Identifisering av renkulturer

4.2.1 Fenotypisk karakterisering

4.2.1.1 Klassisk

Fra de klassiske testene på kulturene er det tydelig like egenskaper for alle kulturene bortsett fra H. Selv om koloniene ser ulike ut med tanke på farge og vekstmønster, er flere av kulturene staver (korte/ovale) og har samme gram-, oksidase- og katalase egenskaper. Når det gjelder gramfarging er det ofte observert gram-negative bakterier i forbindelse med ekstreme miljøer og alternative næringskilder som f.eks. såpe og olje (Dhouib et al. 2003; Kaech et al. 2005; Nishihara et al. 2000), og gram-negative bakterier er ofte katalase- og oksidase positive staver. Det er også observert at gram-negative bakterier tåler forurensning i høyere konsentrasjoner enn gram-positive bakterier (Nye et al. 1994). Kultur H er totalt annerledes enn de øvrige kulturene, og dessuten kanskje ikke helt ren. Veksten ble dårligere når den ble dyrket på medie med penicillin eller Polymixin B, så det kan være at dens evne til å vokse på

såpen er avhengig av at flere arter er til stede for at den skal kunne nyttiggjøre karbonet i såpen.

4.2.1.2 BIOLOG Test System

Identifisering via BIOLOG systemet ga gode resultater for 4 av kulturene. Antatt at resultatene er korrekte er tre av kulturene *Pseudomonas fluorescens* biotype F. Fargen og vekstmønsteret på agar er relativt likt bortsett fra mengden vekst, men på rystekulturer derimot er de tre kulturene ulike. Deres evne til å vokse på såpen er også svært ulik både på agar og i rystekultur. Kultur B har vokst svært dårlig på såpen og er så vidt synlig på agar, kultur E har vokst svært godt, har en svak mørk gul farge i kultur og tykke, hvite kolonier som er vanskelig å skille fra hverandre pga. sammenflyting på agar, mens kultur G også har vokst godt på såpen, men ikke like godt som E, og har sterk grønn-gul farge i kultur og svake nesten usynlige kolonier på agar. A er *Pseudomonas fluorescens* biotype G. Kultur F var ikke mulig å identifisere ordentlig med BIOLOG, men alle resultater viste slekten *Pseudomonas* så det kan antas at dette stemmer. Identifisering av gram negative bakterier via BIOLOG er vellykket i 76-98 % av tilfellene, så det er ikke unaturlig at F ikke er identifisert (Konopka et al. 1998). Den har for øvrig mange felles egenskaper med de andre kulturene og dermed også med *Pseudomonas*, så man kan anta at slekten er identifisert riktig. Resultatene stemmer med beskrivelser for slekten *Pseudomonas* for alle kulturene, de er bl.a. obligat aerobe og psykrotrofe (temperatur 4-40°C, optimum 25-30°C) staver som oftest er gram negative og oksidase- og katalase positive. *Pseudomonas* slekten tilhører familien *Pseudomonadaceae* og orden *Pseudomonadales* under klasse Gammaproteobacteria og fylum *Proteobacteria*. Slekten er svært tilpasningsdyktig til ulike karbonkilder, og dominerer ofte aerobe miljøer hvor tilgangen på organiske karbonkilder er begrenset. Den har blitt isolert fra miljøer forurensset av bl.a. tensider, og er den forbundet med vekst på og nedbrytning av disse (He et al. 2006; Nishihara et al. 2000; Nye et al. 1994). Generelt har arter i *Pseudomonas* slekten delvis proteolytiske og lipolytiske egenskaper og delvis evne til denitrifikasjon, og de er alle forbundet med vann. Gruppen med fluoreserende *Pseudomonas* (inkl. *P. fluorescens*) kan bruke ca 80 ulike karbon- og energikilder og er viktige i miljøet ved mineralisering av organiske stoffer (Prescott et al. 2005).

Ved å se nærmere på vekst til kulturene i de ulike karbonkildene og stoffgruppene kan de vokse på og nyttiggjøre seg fra 40 (F) til 59 (G) av 95 totalt, og de har et bredt spekter med

stofftyper de kan vokse på. F kommer dårligst ut, og det kan være noe med kulturen som gjør at den ikke vokser bra nok selv om den har potensial til det, og dermed ikke blir identifisert riktig. Den kan også være en ukjent art eller stamme av *Pseudomonas* eller en av artene som ikke er en del av BIOLOG databasen. Generelt vokser alle kulturene stort sett på de samme stoffgruppene og for alle bortsett fra E er det en gruppe for hver kultur som ikke er representert som karbonkilde. I følge BIOLOG skal kulturene kunne vokse på bl.a. aromater, aminer og alkoholer.

4.2.2 Molekylær karakterisering

Sekvensering bekreftet at renkulturene var i slekten *Pseudomonas*, men ga ikke mer spesifikt resultat enn BIOLOG. *Pseudomonas* spp. sto for en stor andel av resultatene, deriblant *P. fluorescens* på samtlige som ble identifisert til dette i BIOLOG. Sekvenseringen gir derimot ingen informasjon om hvilke biotyper av *P. fluorescens* som har lignende sekvens, så videre klassifisering er ikke mulig for disse. B, E og G ga også ulike resultater slik at det underbygger teorien om at disse ikke er stammer med ulike egenskaper, identifisert til samme biotype av samme art. For F kulturen var det flere andre treff og ikke *P. fluorescens*, så denne forblir uidentifisert lengre enn til slekt. Da slekten *Pseudomonas* inneholder en rekke arter med samme egenskaper er det vanskelig å identifisere videre når det ikke er vellykket med BIOLOG eller sekvensering. Kultur H ble også forsøkt identifisert via sekvensering, og også her var flere *Pseudomonas* arter mulige, med 98-99 % likhet, i tillegg en *Rhizobium* sp., så denne er vanskelig å karakterisere. Den har flere felles egenskaper med *Pseudomonas*, men siden den var vanskelig å dyrke er det ikke sikre resultater fra noen av testene.

4.3 Effekt av Remikraft 703 på bakterier

4.3.1 Vekstegenskaper

4.3.1.1 Optisk tetthet

Det ser det ut til at vekst i kulturene fra sedimenteringskammeret (SK) hemmes ved høyere såpekonsentrasjon, med et par unntak. OD for prøve 1-1 ved 0,25% og prøve 1-3 0,5% er begge høyere enn forventet, men begge hadde blitt innkubert ved risting mens de andre

prøvene ikke var det, og det kan ha ført til økt vekst i de pga økt tilgang på O_2 og dermed kan disse være usikre og kan avvikene kan antas å skulle være lavere, noe som ville betydd at de var i tråd med resten av kulturene. Dermed kan det være en korrelasjon mellom økt såpemengde og lavere celletetthet, noe som stemmer med tidligere observert vekst hvor kulturene har vokst bedre på 0,125 % enn 1 % såpe.

Ser man på hovedbassenget er det også en korrelasjon mellom vekst og såpekonsentrasjoner. Hos 2-2 er 0,25 %, 0,125 % og kontrollen rundt 0,7- 0,85 nm, noe som er målegrensen for spektrofotometeret, dermed kan man anta at forskjellene mellom disse tre hadde vært større dersom de hadde blitt fortynne. 0,5% i samme prøven var uten vekst, noe som kan være en feil ved inokulering av kultur. Kulturene fra hovedbassenget i prøve 3 og 4 har generelt vokst dårligere på såpe enn de fra sedimenteringskammeret, og dette kan også gjelde for prøve 1 og 2 og være en årsak. Kontrollen til 1-2 har dårligere vekst enn forventet, noe som også kan komme av feil i overføring av kulturer.

4.3.1.2 Generasjonstid og vekstkurve

Renkultur

Som i tidligere forsøk er det tydelig her at såpen ikke hemmer veksten, men den øker vekstfasen og gir langsommere vekst. Effekten ses først betydelig ved 1 %, her er forskjellen i generasjonstid i forhold til nærmeste konsentrasjon størst, men effekt er også noe tilstede ved 0,5 % og i de andre, generasjonstiden øker noe for hver økende såpekonsentrasjon. Derimot er selve vekstkurven og lagfasen omtrent den samme for kontroll, 0,125 % og 0,25 %. Resultatene for F viser at kulturen ikke er i stand til å vokse på 2 % såpe, til og med ved start var det ingen celler som vokste på skålene, dvs. de har umiddelbart dødd i kontakt med såpen.

Totaltallet var litt over CFU ved begge uttak, noe som kan være pga. døde celler som ikke enda har lysert, da det også var mye bakterier i 2 % konsentrasjonen selv om alle ved CFU var døde. Totaltallet for denne konsentrasjonen er derimot mye høyere enn startkonsentrasjonen var i kulturene. En forklaring kan være mikroskoperingen av de SYBR-Green fargede filtrene, da det var svært få celler på de og beregningen av antall celler pr ml derfor kan ha vært svært unøyaktig. Det tas derfor ikke særlig hensyn til totaltallene i dette forsøket.

Estimeringen som ble gjort pga. feil fortynninger ved noen av uttakene skal være gode og nøyaktige og passer bra med resten av uttakene, derfor blir det ikke gjort unntak for disse. Kontrollen ved 75,5 time var imidlertid svært lav i forhold til det den burde vært, så denne bør ses bort ifra, da det ikke er noen trend at antallet synker. Det kan være for varm glasstav ved utstrykning f.eks. som har drept noen bakterier.

Anrikningskulturer

Resultatene for anrikningskulturene er stort sett det samme som for renkulturen. Det estimerte antallet for 1-3 1 % stemmer med vekstkurven så det blir ikke regnet som feil. I dette forsøket er det svært tydelig at såpen har en hemmende effekt på veksten ved 1 % i forhold til 0,125 %, men sluttantallet er også her det samme, så veksten blir ikke hemmet totalt, bare hindret og forsinket. Også her er det kun effekt ved at lagfasen økes, noe som betyr at bakteriene kun trenger ekstra tid for å venne seg til såpen, i tillegg fordobles generasjonstiden når såpekonsentrasjonen økes fra 0,125 % til 1 %, slik at veksten tydeligvis hemmes noe. Generasjonstiden er også lengre for anrikningskulturene enn renkulturene. Totaltallet her er også noe høyere enn CFU, men at 2-2 0,125 % har sunket med tiden kan være en feil pga. samme årsak som nevnt under renkulturer. Antallet stemmer godt overens med CFU, de tre kulturene på 1 % såpe er ved 24 timer mye lavere enn de på 0,125 %, men alle er stort sett det samme ved 126 timer, slik at de på 1 % bare bruker lengre tid på å nå samme antall.

4.3.2 Toleranse for såpen ved ulike konsentrasjoner

Forsøkene viser at R2A og KPG ødelegger effekten av såpen på cellene og gjør at enten såpen blir ineffektiv, eller at cellene blir mer motstandsdyktige. Mekanismen er vanskelig å bestemme uten å vite mer om hvordan såpen reagerer med mediet eller hvorfor den er effektiv baktericid ved 1 % løsning kun i vann. Ved første forsøk var det mindre toleranse for såpen hos alle kulturene, ved neste forsøk overlevde F lengre og G overlevde i såpe, i motsetning til i første forsøk. G var nyere kultur andre gangen, slik at det kan ha virket inn på toleransen for såpen, mens F var samme kultur begge gangene og årsaken til forskjellen er usikker. Generelt er det F som klarer seg best på såpe, deretter G og dårligst *E. coli*. I vann er det tydelig at 1 % konsentrasjon av såpe er fullstendig hemmende på alle kulturene, dvs. komponentene i såpen er toksiske ved 100-500 µg/ml når de befinner seg i samme løsning. 0,5 % var toksiske for G og *E. coli* etter hhv. 30 og 5 minutter, noe som tilsvarer en giftighet på 50-250 µg/ml for såpestoffene.

Forsøkene med kultur F og *E. coli* inokulert til R2A og KPG med opptil 2 % såpe viste at bakteriene kunne vokse og danne ordentlig vekst i 2 % på KPG men dårligere på R2A, noen som betyr at KPG i større grad hemmer effekten av såpa. KPG er et mer næringsrikt medie enn R2A, og i forhold til konsistens er den også tykkere. *E. coli* vokste bedre og raskere på KPG enn F, men dårligere på R2A, noe som forklares ved at *E. coli* ikke er godt egnet til å dyrkes på næringsfattig medium, derimot er det pga. dette rart at kulturen kan vokse på R2A og såpe da det burde vært uegnet medium for kulturen. At også *E. coli* kunne vokse på 1 % såpe uansett medium, slik bare noen utvalgte renkulturer isolert fra dammen klarte, betyr at det muligens ikke trenger å være spesielt tilpassede bakterier som kan vokse på såpen, men at flere arter som aldri har vært utsatt for den tidligere også kan klare det.

I vann i miljøet vil det være flere næringsstoffer til stede enn i destillert vann som ble benyttet i forsøkene, og dermed kan forsøket med såpe i R2A kunne være en grov indikator på hva bakteriene tåler i miljøet, selv om mediet nok er mer næringsrikt enn dammen. I R2A vil 2 % såpe hemme veksten av bakteriene, men de dør ikke nødvendigvis med en gang. I tidligere forsøk derimot, hvor vekstkurven på såpe ble undersøkt, var det ingen dyrkbare bakterier ved start i kultur med 2 % såpe, mens totaltallet etter 28,5 og 97 timer viste et høyt antall celler, noe som kan bety at metabolismen til bakteriene hemmes men at cellene ikke lyserer like raskt.

4.3.3 Endringer i artssammensetning

Sammenligning av DGGE bånd fra vann-/sedimentprøve og tilhørende kultur hadde vært en god del enklere dersom de hadde vært ved siden av hverandre på gelen, men det ble dessverre ikke gjort. Totalt er det omtrent 90 % flere ulike bånd i prøvene enn i kulturene. En stor del av denne forskjellen er at kulturene representerer den kulturelle fraksjonen av mikroorganismer mens prøven tilsvarer hele samfunnet, i tillegg er det tidligere observert at ikke alle bakterier fra dammen kan vokse på såpe (henv. til kap. 3.1.2), slik at kulturene naturlig vil ha selektert bort en stor andel bakterier. Det totale antall bånd i vann- og sedimentene er relativt lavt og årsaken kan f.eks. være at det ikke har vært vellykket å ekstrahere DNA fra alle bakteriene. Denne teorien bekreftes ved at opptil 50 % av alle båndene i kulturene ikke finnes i tilhørende vann- eller sedimentprøve. Årsaken kan være at de i miljøet finnes i lavt antall og overskygges av dominerende arter slik at de ikke har blitt med i resultatene. Når dyrket på såpe endres sammensetningen av arter (gitt som bånd) vesentlig, antallet synker og nye arter

dominerer, dvs. alle bakteriene som er dyrkbare på såpe er ikke dominerende i dammen. 14 av båndene i prøvene er å finne kun på ett av stedene, slik at variasjonen mellom lokalitetene i dammen og mellom de tre dammene er stor. I tillegg er det forskjeller mellom kulturene, siden 4 av båndene kun finnes i én kultur. En annen ting er bånd i kulturene som ikke finnes i tilhørende prøve men som finnes i en annen prøve, noe som gjør forskjellene mellom samfunnet i de ulike prøvene og dammene tydeligere med tanke på hvilke arter som dominerer. En art som er dyrkbar på såpe kan være fraværende i prøven kulturen er hentet fra, men være dominerende et annet sted i dammen. Det er diskusjoner om hvor mye vekt som kan legges på DGGE resultater med tanke på antall bånd i forhold til antall prøver når ikke båndene blir sekvensert og identifisert. I dette tilfellet er bånd 1 og 19 til stede i alle kulturene så om disse skulle komme fra samme bakterie er det uansett variasjoner i de andre båndene, slik at det er minst to arter i hver kultur.

4.3.4 Vekst på næringsfattig medium

Renkulturer

Bakterier som vokser under stress og ikke-optimale forhold er ofte mindre enn vanlige celler og dermed er det som i dette tilfellet ofte vanskelig å bestemme vekst kun visuelt i kulturer. Det er vanskelig å estimere veksten i disse kulturene ettersom det ikke ble foretatt noen ny platespredning med flere fortynninger, men estimeringen gir likevel inntrykk av at vekst har funnet sted og at bakteriene muligens kan vokse med såpen som eneste karbonkilde (uten gjærekstrakt) og nyttiggjøre seg denne. Imidlertid er det ikke tydelig mer vekst på 1 % enn 0,125 %, så det kan ikke konkluderes med at såpen bidrar fullstendig som karbonkilde, da 0,125 % konsentrasjonen ser ut til å være omtrent lik kontrollen og har ingen negativ eller positiv effekt på vekst. Resultatene stemmer med tidligere resultater hvor såpen i disse konsentrasjonene ikke fullstendig hemmer vekst men bare hindrer og forsinker den. Det estimert til mer vekst i kontrollene enn i såpekulturene, men ettersom dette kun er estimat og kontrollene også ble fortynnet mer kan det like godt være at de har like mye vekst, eller at kontrollene har mindre vekst enn kulturene med såpe. Imidlertid er det tydelig at det har foregått vekst i de, noe som betyr at kulturene E og F til en viss grad kan vokse på ekstremt næringsfattig medium uten karbonkilde, eller at inokulumet selv etter 2 overføringer fremdeles har inneholdt noe næringsstoffer fra tidligere R2A slik at cellene har hatt noe

næringsstoff tilgjengelig, og deretter levd på gamle celler som har lysert. Dette gjelder også for 0,125 % konsentrasjonen.

Anrikningskulturer

Det er tydelig vekst i de fleste kulturene, men som tidligere observert er kulturer fra hovedbassenget dårligere tilpasset vekst på såpe og disse var stort sett uten vekst på 1 %. 0,125 % såpe virker som nevnt omtrent som kontroll hos alle kulturene, og denne konsentrasjonen kan være for lav til at såpen har noen effekt som inhibitor eller som næringskilde. Det er ingen korrelasjon å se mellom såpemengde og vekst, slik at det ikke kan konkluderes med at såpen ved 1 % bidrar som karbonkilde i forhold til 0,125 %.

4.3.5 Nedbrytning av komponenter i såpen

Det har skjedd en nedgang i mengde AEO i samtlige prøver, mest nedgang er det for C11 i forhold til C9 og C10, men det virker ikke som det er noen sammenheng mellom lengde på etoksileringene og nedgang. Cellefrier prøver ble analysert, og det er usikkert om noe såpestoffer kan være bundet til bakteriene og ha blitt fjernet fra prøven på den måten, men man kan gå ut ifra at nedgang i AEO betyr nedbrytning av stoffene via bakterier i de fleste prøvene.

F hadde en lav nedbrytning for AEO på 1 % såpe og dette kan være så lite at det kun har forsvunnet med bakteriene, men dette er usikkert så det regnes som nedbrytning. Til tross for at det så ut som dårlig vekst i de fleste kulturene har dermed AEO blitt brutt ned til en viss grad i alle. Som nevnt tidligere ses en betydelig veksthemmende effekt av såpen først ved 1 %, slik at den lavere nedbrytningen ved denne konsentrasjonen er naturlig. Men siden nedbrytning faktisk har funnet sted også i 1 % kan dette bety at konsentrasjonen hemmer veksten men ikke fullstendig, da metabolisme må ha funnet sted. Som kjent fra vil 1 % såpe øke lagfasen og generasjonstiden, slik at nedbrytning vil foregå langsommere. Derimot viste vekstkurven til F at vekstfasen var relativt kort og at kulturen etter 54,5 time var over i stasjonær fase og hadde samme antall som kulturer på lavere såpekonsentrasjoner. Dette betyr at kulturen skulle vært utvokst etter 14 dager og at samme nedbrytningsrate burde funnet sted, imidlertid var denne kulturen klarere enn den var ved slutten av vekstforsøket, så det kan være at renkulturene, særlig F ikke vokste på sitt beste i dette forsøket. F har vært den renkulturen som under alle forsøkene har vist best vekst på og toleranse for 1 % såpe, så disse resultatene

stemmer ikke helt overens med dette, noe som også tyder på at F kan ha vekst dårligere enn vanlig. At nedbrytning er korrelert med vekst i kulturene er tydelig da det er høyest nedbrytning i 3-1 og 4-1 0,25 % og det er disse som hadde mest vekst i kulturene. Derimot er ikke sammenhengen så klar for 1 %, da 3-1 har høy nedbrytning men så ut til å ha lite vekst, og 4-1 hadde mye vekst men ikke spesielt høy nedbrytning. G hadde av renkulturene høyest rate nedbrytning, mens E var neste. Dette beviser at selv om de begge er identifisert til *P. fluorescens* biotype F er de tydelig to stammer med noe ulike egenskaper for vekst på såpe.

At anrikningskulturene har høyere grad av nedbrytning enn renkulturene viser at bakteriene kanskje ikke bryter ned AEO fullstendig hver for seg, men at nedbrytningen er raskere og mer fullkommen når flere samarbeider noe som kan tyde på at nedbrytningen er avhengig av kommensalisme. Når nedbrytning har forekommet i kulturer hvor det ikke så ut til å være spesielt mye vekst (alle bortsett fra 3-1 0,25 % og 4-1 begge) kan det være enten pga. AEO som har fulgt med cellene i sentrifugering, eller det kan bety at nedbrytning finner sted men cellene bruker ikke energien som dannes til vekst (kometabolisme). Denne forklaringen stemmer også med at kulturene ikke vokste spesielt godt på næringsfattig medium tilsatt såpe, da veksten der var stort sett den samme i kontrollen uten såpe. Toksisiteten til AEO er kjent for å øke med økende karbonkjede og med synkende EO lengde. Dette gjelder ikke nødvendigvis for økning i ett og ett karbon, eller en og en EO, og i dette forsøket gir økt karbonkjede høyere nedbrytning, mens det ikke er betydelig forskjell mellom EO 3-8. Høyere nedbrytning med økende karbonkjede var gjennomgående for alle kulturene i dette forsøket.

4.4 Dyrkning på olje, diesel og PAH

Anrikningskulturene hadde generelt bedre vekst enn renkulturene på olje, diesel og fenantren, noe som stemmer overens med andre forsøk med spesielt olje, hvor det ser ut til at en spesiell art kun bidrar til en del av nedbrytningen, og at fullstendig nedbrytning er avhengig av at flere arter er til stede og kan utføre hver sine trinn. Den dårligste veksten av alle er hos renkultur B, noe som viser at den mest sannsynlig ikke er samme stamme som E og G selv om de kan være samme biotype. B var også eneste stamme som i BIOLOG plater ikke kunne nyttiggjøre seg aromatiske kjemikalier. Bakteriene har lettere for å nyttiggjøre seg av olje og diesel enn av fenantren.

At det er dårligere vekst i kontrollene enn i olje og diesel i flere av kulturene betyr at bakteriene ikke bare vokser på mediet med overførte rester av næringsstoffer fra forrige medium, men at de faktisk benytter oljen og dieselen til karbonkilde. Sammenlignet med det tilsvarende forsøket med R2A1 og R2A2 og såpe samt nedbrytningen av såpe ser det ut til at olje og diesel er enklere for bakteriene og nyttiggjøre seg som karbonkilde enn såpen er.

Veksten i kontrollen blir pga. mulig overføring av næringsstoffer fra forrige kultur derfor en bakgrunn for veksten på de andre stoffene, så det kan se ut til at fenantren ikke betydelig blir benyttet som karbonkilde av noen av disse kulturene, da den i de fleste tilfeller er lik eller dårligere enn kontrollen. Men siden det er noe vekst i de betyr det at bakteriene i det minste tåler fenantren og ikke blir hemmet av det, og alle kulturene bortsett fra B kunne nyttiggjøre seg aromatiske kjemikalier i BIOLOG plater, slik at de har evnen til det.

Generelt for alle kulturene ser det ut til at kulturene som bryter ned AEO i høyere grad også vokser bedre på olje, diesel og fenantren, men det er ingen sammenheng mellom dette og vekst på næringsfattig medium med såpe. Dette kan bety at kulturene ikke nødvendigvis vokser på såpen og bruker den som karbonkilde men at de bryter ned AEO likevel.

4.5 Gassanalyser av sediment

Mikroorganismer i sedimentene fra sedimenteringskammeret og hovedbassenget i Vassum produserer store mengder metan (CH_4), noe som tyder på at de har anaerobe forhold og mye organisk materiale tilgjengelig, samtidig som de ikke har tilgang på andre elektronakseptorer. Sedimenteringskammeret ved innløpet brukte lengst tid på å produsere store mengder, men til sist var det mer gassproduksjon der enn de andre stedene. Denne prøven er tatt rett ved innløpet for avrenning og kan bestå av flere og større mengder toksiske stoffer og forurensninger enn resten av dammen hvor forurensninger vil ha blitt brutt ned eller bundet til partikler, noe som vil ta lengre tid for stoffene i innløpsprøven å gjøre.

N_2 mengden er stort sett den samme i alle prøvene ved begge tidspunkt, mens O_2 er oppbrukt og CO_2 har blitt dannet. Som forutsetning for metanproduksjon er forholdene anaerobe, og dermed stemmer det at det ikke er noe store mengder O_2 til stede. Dannelsen av CO_2 tyder i likhet med metanproduksjon på at det er anaerobe forhold med organisk materiale tilgjengelig.

4.6 Sammenfattende diskusjon

Når det gjelder antall bakterier i dammene, dyrkbare og totaltall, er det forskjeller mellom de to bassengene i Vassum hvor sedimenteringskammeret har høyest antall, og det er i tillegg høyere antall bakterier i sedimentet, som også hadde høy metanproduksjon. De dyrkbare bakteriene er dyrket aerobt og dermed er de ikke obligat anaerobe, dermed kan det være et mye høyere antall i sedimentet enn vist av CFU, siden metanproduksjon foregår anaerobt. Dette reflekteres også i at totaltallet var vesentlig mye høyere enn CFU i sedimentet enn i vannprøvene. Vassum ser ut til å ha høyest antall bakterier av de tre dammene, men forskjellene varierer med dyrkbart antall og totaltall så det er vanskelig å bestemme. Bakteriene som finnes i dammen vokser dårligere ved lavere temperaturer ($< 20^{\circ}\text{C}$) og ser ut til å vokse noe dårligere på næringsrikt medium enn på næringsfattig.

Såpen som brukes til tunnelvask, Remikraft 703, vil blandet i vekstmedium øke lagfasen og generasjonstiden til bakteriene isolert fra dammene, når den er i konsentrasjon på 1 %. Lavere konsentrasjoner har ingen større betydning for vekst, mens høyere konsentrasjoner hemmer vekst fullstendig og ser ut til å drepe bakteriene. Når såpen er blandet i vann er den derimot drepende ved 1 % mens noen renkulturer kan tåle den i $0,5 \% \leq 30$ minutter, noe som tilsvarer en konsentrasjon på 50-250 $\mu\text{g/ml}$, mye høyere enn kravet for miljøvennlige tensider som er $> 1 \mu\text{g/ml}$.

Når bakterier dyrkes med såpen, spesielt i renkulturer, vil veksten se svak eller fraværende ut, men vekst og nedbrytning av komponenter som alkoholetoksilatene (AEO) er bevist å finne sted likevel. Nedbrytning av AEO er bedre når såpen opprinnelig er i konsentrasjon på 0,25 % i vekstmediet i forhold til 1 %, noe som kan tyde på at såpen til en viss grad er toksisk og hemmer nedbrytning ved 1 % men at bakteriene ikke dør, og en viss metabolisme og nedbrytning finner sted. Anrikningskulturene hadde høyere rate nedbrytning enn renkulturene, noe som kan tyde på at bakteriene hver for seg kun utfører ett eller noen få trinn i nedbrytningen og er avhengig av andre arter for at fullstendig mineralisering skal finne sted. For anrikningskulturene var nedbrytningsraten av totale AEO fra ~ 20 -80 % ved 1 % såpe, mens den var ~ 80 -100 % ved 0,25 % såpe i løpet av 14 dager, noe som er i nærheten av kravet til nedbrytbarhet på $> 80 \%$ i løpet av 28 dager avhengig av såpens konsentrasjon i miljøet.

Bakteriekulturene som var dyrkbare på såpe var også til en viss grad dyrkbare på fenantren, olje og diesel, noen bedre enn andre, og anrikningskulturene hadde også her generelt best vekst. Kulturene som best kunne bryte ned AEO i såpen hadde også den kraftigste veksten på forurensning.

Referanser

AgroMetBase. (2007). I: *Bioforsk*. Lokalisert i online database på World Wide Web: <http://lmt.bioforsk.no/agrometbase/getweatherdata.php>.

Aryal, R. K., Furumai, H., Nakajima, F. & Boller, M. (2006). Characteristics of particle-associated PAHs in a first flush of a highway runoff. *Water Science and Technology*, 53 (2): 245-251.

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, G. (2003). Risk Assessment Trisodium Nitritotriacetat cas-no 5064-31-3, European Chemicals Bureau.

Chemicals, U. (2003). *SIDS Initial Assessment Report For Sodium Carbonate*. Lokalisert på World Wide Web: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/Naco.pdf>.

Deletic, A. & Orr, D. W. (2005). Pollution Buildup on Road Surfaces. *Journal of Environmental Engineering*, 131 (1): 49-59.

Dhouib, A., Hamad, N., Hassaïri, I. & Sayadi, S. (2003). Degradation of Anionic Surfactants by *Citrobacter braakii*. *Process Biochemistry*, 38 (8): 1245-1250.

Dyer, S. D., Sanderson, H., Waite, S. W., Van Compernelle, R., Price, B., Nielsen, A. M., Evans, A., Decarvalho, A. J., Hooton, D. J. & Sherren, A. J. (2006). Assessment of alcohol ethoxylate surfactants and fatty alcohols mixtures in river sediments and prospective risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 120 (1-3): 45-63.

Garcia, M. T., Ribosa, I., Guindulain, T., Sanchez-Leal, J. & Vives-Rego, J. (2001). Fate and effect of monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 111 (1): 169-175.

Garland, J. L. & Mills, A. L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (8): 2351-2359.

Harrison, R. M. & Wilson, S. J. (1985). The Chemical Composition of Highway Drainage Waters, I. Major Ions and Selected Trace Metals. *The Science of the Total Environment*, 43 (1-2): 63-77.

He, F. J., Zhang, X. Q. & Liu, Z. H. (2006). A new sensor method for studying the effect of surfactants on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 113 (1): 428-434.

Herrmann, R. (1981). Transport of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Through a Partly Urbanized River Basin. *Water Air and Soil Pollution*, 16 (4): 445-467.

HMS Datablad Remikraft 703. (2006). Remitek AS.

Kaech, A., Vallotton, N. & Egli, T. (2005). Isolation and Characterization of Heterotrophic Bacteria Able to Grow Aerobically With Quaternary Ammonium Alcohols as Sole Source of Carbon and Nitrogen. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 230-241.

Konopka, A., Oliver, L. & Turco, R. F. (1998). The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology*, 35 (2): 103-115.

Krein, A. & Schorer, M. (2000). Road runoff pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons and its contribution to river sediments. *Water Research*, 34 (16): 4110-4115.

Leistad, A. (2007). Norwegian University of Life Science.

Magnus, C. (1996). *Renhold - høgre utdanning*. Oslo, Yrkeslitteratur as. 668 s.

Maier, R. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (2000). *Environmental Microbiology*. 1. utg., Academic Press.

Material Safety Data Sheet Triethanolamine. (2006). The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory Oxford University.

Meland, S., Rosseland, B. O. & Salbu, B. (2007). Miljøeffekter av Veiavrenning, Norwegian University of Life Science.

Muyzer, G., Dewaal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S Ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3): 695-700.

Nishihara, T., Okamoto, T. & Nishiyama, N. (2000). Biodegradation of didecyldimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (4): 641-647.

Noble, R. & Fuhrman, J. (1998). Use of SYBR Green I for Rapid Epifluorescence Counts of Marine Viruses and Bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14 (2): 113-118.

Nye, J. V., Guerin, W. F. & Boyd, S. A. (1994). Heterotrophic Activity of Microorganisms in Soils Treated with Quaternary Ammonium-Compounds. *Environmental Science & Technology*, 28 (5): 944-951.

Patel, J. A. (2005). Briefing - Review of CIRIA report 142 on highway pollutants. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers-Transport*, 158 (TR'3): 137-138.

Pers. medd. Frank Andersen. (2006). Veidrift AS.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2005). *Microbiology*. 6. utg. New York, McGraw-Hill.

Roseth, R. & Amundsen, C. E. (2006). *Vaskevann Fra Vegtunneler - Forurensningsstoffer og Behandling*, Bioforsk. Lokalisert på World Wide Web:
http://gammel.jordforsk.no/fagnat/vaskevann_fra_vegtuneller.htm.

Roseth, R., Snilsberg, P. & Amundsen, C. E. (2002). Naturbaserte behandlingsanlegg for avrenning fra veg og tunnelvask. *Jordforsk rapport*, 01/2002, Jordforsk.

Roseth, R. & Søvik, A. K. (2006). Nedbryting av såper til tunnelvask Statens Vegvesen, Utbyggingsavdelingen.

Snilsberg, P., Roseth, R. & Amundsen, C. E. (2002). *Naturbaserte behandlingsanlegg for vegavrenning - undersøkelse av rensegrad og anleggsfunksjon for tre anlegg langs ny E6 Korsegården - Vassum i Ås kommune i 2000 og 2001*. Jordforsk, Jordforsk.

Stalmans, M., Matthijs, E. & Deoude, N. T. (1991). Fate and Effect of Detergent Chemicals in the Marine and Estuarine Environment. *Water Science and Technology*, 24 (10): 115-126.

Statens Forurensningstilsyn. (2006). *Miljøstatus i Norge*. Lokalisert 08.02.2006 på World Wide Web: http://www.miljostatus.no/templates/PageWithRightListing_2882.aspx.

Thomson, N. R., McBean, E. A., Snodgrass, W. & Monstrenko, I. B. (1997). Highway Stormwater Runoff Quality: Development of Surrogate Parameter Relationships. *Water, Air, and Soil Pollution*, 94 (3-4): 307-347.

Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2004). *Microbiology an Introduction*. 8th utg., Daryl Fox.

vanLoon, G. W. & Duffy, S. J. (2005). *Environmental Chemistry - a Global Perspective*. 2. utg. Oxford, Oxford University Press.

White, V. E. & Knowles, C. J. (2000). Effect of metal complexation on the bioavailability of nitrilotriacetic acid to *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600. *Archives of Microbiology*, 173 (5-6): 373-382.

Appendiks

I. Agar og medier

R2A

pr 1 L dH₂O:

0,5 g	Gjærekstrakt	}	Flytende medie
0,5 g	Proteose Peptone (difco nr. 3)		
0,5 g	Casamino Acids		
0,5 g	D-Glukose		
0,5 g	Stivelse (soluble starch)		
0,3 g	Natriumpyruvat		
0,3 g	K ₂ HPO ₄		
0,05 g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O		
15 g	Agar		

Justeres til pH = 7,2 ved å tilsette K₂HPO₄ før evt. agar tilsettes. Pr liter medie brukes ~0,1-0,2 g.

Modifisert R2A1:

pr 1 L dH₂O:

0,1 g	Gjærekstrakt
1 g	NH ₄ Cl
0,3 g	Natriumpyruvat
0,3 g	KH ₂ PO ₄
0,05 g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O

Justeres til pH = 7,2 ved å tilsette K₂HPO₄.

Modifisert R2A2:

pr 1 L dH₂O:

1 g	NH ₄ Cl
0,3 g	Natriumpyruvat
0,3 g	KH ₂ PO ₄
0,05 g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O

Justeres til pH = 7,2 ved å tilsette K₂HPO₄

Basalmedium BMM:

pr 1 L dH₂O:

2,5 g	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
1,3 g	KH ₂ PO ₄
0,5 g	NH ₄ Cl
0,2 g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
0,1 g	Gjærekstrakt

Mikroelementer:

1,0 ml	AZ-løsning
0,5 ml	FeSO ₄ (1 % løsning)
0,5 ml	Na ₂ MoO ₄ (1 % løsning)

KPG:

pr 1 L H₂O:

8,0 g Næringsbuljong
0,5 g Gjærekstrakt
15,0 g Agar

} Flytende medie

Inoculation fluid

pr 1 L dH₂O:

0,2 g Gellan Gum
4,0 g NaCl
0,3 g Pluronic F-68

Gellan Gum tilsettes i vannet og varmes under røring til kokepunktet og Gellan Gum er fullstendig oppløst. NaCl tilføres og røres inn til oppløst. Pluronic F-68 tilsettes og røres til oppløst. Autoklaveres ved 121°C i 15 min.

II. Fargeløsninger

Krystallfiolett

2,0 g Krystall fiolett
20,0 ml Etanol 96 %
0,8 g NH₄ oxalat
80,0 g dH₂O

Jod-Jod-Kalium

1,0 g Jod
2,0 g Kalium-Jod
300,0 ml dH₂O

Safranin

10 ml Safranin (2,5 % i 96 % EtOH)
100 ml dH₂O

SYBR-green bruksløsning

2 ml 0,2 µm filtrert dH₂O
5 µl SYBR-Green frossen stock

Lages mørkt i eppendorf rør pakket i aluminiumsfolie.

Monteringsløsning

5 ml PBS Glyserol
50 µl frossen stock

PBS – bufret fysiologisk saltvann

pr. 1 L dH₂O
8,89 g 5 M Na₂HPO₄ (dinatriumhydrogenfosfat)
8,50 g NaCl

PBS Glyserol

250 ml glyserol
250 ml bufret fysiologisk saltvann (PBS)
0,5 ml p-phenylenediamine

III. Molekylære reagenser og buffere

50 x TAE buffer:

1 L:
242 g Tris base (Trizma base)
57,1 ml iseddik
200 ml 0,25M EDTA (Titriplex III) pH = 8

Tilsettes dH₂O til 1 L og autoklaveres.

1 x TAE buffer:

20 ml 50 x TAE buffer tilsettes dH₂O til 1L.

125 mM EDTA, pH = 8

46,53 g Titriplex III tilsettes 1 L dH₂O. NaOH røres inn til pH = 8 og Titriplex er oppløst.

3 M natriumacetat, pH = 5,2

408,1 g natrium acetat x 3 H₂O blandes i 700 ml dH₂O og justeres til pH = 5,2 med iseddik, deretter tilsettes dH₂O til 1 L.

10 x loading buffer

2 ml 1 % Bromfenolblå løsning
5 ml 50 % Glycerol løsning
8 ml dH₂O

PCR Master mix 1F-5R

445 µl = 10 reaksjoner:
50 µl 10 x Taq Buffer
40 µl 10 mM dNTP (2,5 mM av hver)
20 µl Primer 1F 25mM
20 µl Primer 5R 25mM
5 µl 1% BSA
310 µl dH₂O

PCR (DGGE) Master mix 8F-GC – 518R

445 µl = 10 reaksjoner:

50 µl	10 x Taq Buffer
40 µl	10mM dNPT (2,5 mM av hver)
20 µl	Primer 8F-GC hale 25mM
20 µl	Primer 518R 25mM
5 µl	1% BSA
310 µl	dH ₂ O

DGGE Løsninger

	58 % (High)	40 % (Low)	0 % (0)
50 x TAE buffer	2,00 ml	2,00 ml	2,00 ml
Urea	24,35 g	16,80 g	-
Formamid	23,20 ml	16,00 ml	-
Acrlamid 30 %	23,3 ml	40,00 ml	16,70 ml

Hver løsning tilsettes dH₂O til 100 ml.

IV. Datatabeller

Dyrkbart antall og totaltall

Tabell 1, antall bakterier (log) pr ml vann/sediment dyrket på R2A og KPG, prøve 1.

Dager	R2A					KPG				
	5	10	18	24	33	5	10	18	24	33
1-1 5°C	4,00	5,45	5,51	5,51	5,51	3,90	5,21	5,26	5,27	5,27
1-1 10°C	5,20	5,41	5,52	5,53	5,53	4,87	5,15	5,17	5,17	5,17
1-1 15°C	5,43	5,53	5,56	5,56	5,56	5,04	5,08	5,08	5,08	5,08
1-1 20°C	4,89	4,89	5,27	5,27	5,27	5,02	5,02	5,08	5,08	5,08
1-2 5°C	2,40	4,76	4,86	4,94	5,09	2,70	4,52	4,67	4,73	4,75
1-2 10°C	4,59	4,91	5,31	5,34	5,36	4,16	4,39	4,53	4,58	4,61
1-2 15°C	4,57	5,18	5,21	5,23	5,23	4,71	4,80	4,81	4,82	4,82
1-2 20°C	5,14	5,45	5,48	5,51	5,51	4,78	4,85	4,86	4,87	4,87
1-3 5°C	2,40	5,53	5,68	5,80	5,90	3,51	5,16	5,34	5,39	5,41
1-3 10°C	5,16	5,54	5,92	5,99	6,01	4,85	5,19	5,34	5,38	5,40
1-3 15°C	5,32	5,66	5,83	5,91	5,91	5,34	5,59	5,64	5,66	5,67
1-3 20°C	5,79	6,05	6,06	6,06	6,06	5,35	5,63	5,64	5,65	5,65

Tabell 2, antall bakterier (log) pr ml vann/sediment dyrket på R2A og KPG, prøve 2.

Dager	R2A				KPG			
	5	10	20	25	5	10	20	25
2-1 5°C	4,56	6,12	6,20	6,38	4,59	5,98	6,06	6,07
2-1 10°C	5,90	6,22	6,31	6,37	5,93	6,04	6,10	6,05
2-1 15°C	6,19	6,51	6,54	6,55	5,79	5,97	6,07	6,07
2-1 20°C	6,19	6,52	6,53	6,37	5,81	6,03	6,06	5,97
2-2 5°C	2,70	5,81	6,18	6,26	3,22	5,67	5,82	5,86
2-2 10°C	5,31	5,85	6,46	6,33	5,61	5,73	5,99	6,05
2-2 15°C	6,00	6,53	6,66	6,66	5,73	6,01	6,21	6,21
2-2 20°C	6,08	6,63	6,66	6,66	5,77	6,09	6,13	6,13

Tabell 3, antall bakterier (log) pr ml vann/sediment dyrket på R2A og KPG, prøve 3.

R2A	3 dager	5 dager	10 dager	19 dager	28 dager
3-1 5°C	0,00	0,00	4,22	5,35	5,64
3-1 10°C	0,00	0,00	4,67	5,88	6,12
3-1 15°C	0,00	0,00	5,36	6,25	6,38
3-1 20°C	4,22	4,22	6,13	6,23	6,31
3-3 5°C	0,00	0,00	6,12	6,61	6,90
3-3 10°C	0,00	0,00	6,43	6,95	7,26
3-3 15°C	5,80	5,92	7,10	7,40	7,43
3-3 20°C	6,40	6,39	7,22	7,49	7,53
3-2 5°C	0,00	0,00	0,00	0,00	4,18
3-2 10°C	0,00	0,00	0,00	4,48	5,22
3-2 15°C	0,00	0,00	5,36	5,75	5,90
3-2 20°C	0,00	4,30	5,80	6,09	6,09
3-5 5°C	0,00	0,00	6,04	6,35	6,65
3-5 10°C	0,00	5,63	6,16	6,49	6,75
3-5 15°C	5,85	6,27	6,58	6,91	7,04
3-5 20°C	6,12	6,46	6,90	7,04	7,09
KPG	3 dager	5 dager	10 dager	19 dager	28 dager
3-1 5°C	0,00	0,00	3,22	4,48	4,70
3-1 10°C	0,00	0,00	3,52	5,03	5,15
3-1 15°C	0,00	3,52	4,77	5,51	5,52
3-1 20°C	0,00	4,71	5,85	5,85	5,85
3-3 5°C	0,00	0,00	5,96	6,29	6,53
3-3 10°C	0,00	5,58	6,31	6,83	6,86
3-3 15°C	5,68	6,35	6,81	6,99	7,04
3-3 20°C	6,21	6,74	6,90	7,06	7,19
3-2 5°C	0,00	0,00	0,00	3,22	3,22
3-2 10°C	0,00	0,00	0,00	3,52	3,92
3-2 15°C	0,00	0,00	3,52	4,94	5,11
3-2 20°C	3,22	4,00	4,97	5,24	5,24
3-5 5°C	0,00	0,00	5,74	6,09	6,12
3-5 10°C	0,00	5,45	5,95	6,19	6,38
3-5 15°C	5,34	5,95	6,18	6,58	6,68
3-5 20°C	5,92	6,33	6,71	6,74	6,75

Tabell 4, antall bakterier (log) pr ml i prøve 4 for hver såpekonsentrasjon i agar.

Dager:	7	11	19	22	29	33
Kontroll						
4-1	5,35	5,58	5,89	5,92	5,93	5,93
4-2	4,79	5,03	6,04	6,06	6,06	6,45
4-3	3,00	4,01	4,37	4,37	4,39	4,57
4-4	4,11	4,24	4,68	4,89	5,55	5,99
4-5	6,62	6,96	7,07	7,09	7,15	7,19
4-7	3,59	3,93	4,33	4,37	4,39	4,47
4-8	2,05	3,22	4,39	4,49	4,58	4,74
0,25 %						
4-1	3,79	3,79	4,27	4,30	4,91	4,92
4-2	4,08	4,10	4,13	4,13	4,45	4,73
4-3	2,05	2,35	3,28	3,28	3,28	3,28
4-4	0,00	2,52	2,52	4,08	4,10	4,14
4-5	5,30	6,58	7,27	7,27	7,28	7,28
4-7	3,41	4,21	4,28	4,81	5,56	5,56
4-8	0,00	2,35	3,44	3,44	3,90	4,31
0,5 %						
4-1	3,22	3,22	3,56	3,58	3,58	3,58
4-2	2,52	3,19	5,70	6,08	6,09	6,11
4-3	0,00	0,00	4,67	5,47	5,49	5,65
4-4	0,00	0,00	0,00	2,35	4,76	4,76
4-5	4,49	4,63	4,65	5,28	5,88	5,96
4-7	0,00	0,00	4,52	5,61	6,38	6,39
4-8	0,00	2,05	2,05	2,05	4,91	5,24
1 %						
4-1	2,05	2,05	3,35	6,43	6,50	6,50
4-2	2,05	3,39	3,94	4,91	5,02	5,11
4-3	0,00	0,00	0,00	5,01	5,33	5,59
4-4	0,00	0,00	4,67	5,48	5,70	5,73
4-5	3,22	3,25	3,25	4,68	4,78	5,03
4-7	0,00	0,00	0,00	5,39	5,48	5,62
4-8	0,00	0,00	0,00	4,81	4,82	4,83

Tabell 5, antall bakterier pr ml (log) i prøve 4 etter siste telling av skåler, inkludert totaltall

Prøve	Kontroll	0,25 %	0,50 %	1,00 %	Totaltall
4-1	5,93	6,29	3,58	6,50	7,10
4-2	6,45	4,73	6,11	5,11	7,06
4-3	4,57	3,28	5,65	5,59	7,12
4-4	5,99	4,14	4,76	5,73	7,11
4-5	7,19	7,28	5,96	5,03	8,70
4-7	4,47	5,56	6,39	5,62	7,10
4-8	4,74	4,31	5,24	4,83	6,87

BIOLOG Test System

Tabell 6, innholdet i brønnene på en GN2 BIOLOG plate, 95 sukkerarter og 1 kontroll

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Vann	α -Cyclodextrin	Dextrin	Glycogen	Tween 40	Tween 80	N-Acetyl-D-Galactosamine	N-Acetyl-D-Glucosamine	Adonitol	L-Arabinose	D-Arabitol	D-Cellobiose
B	i-Erythritol	D-Fructose	L-Fucose	D-Galactose	Gentobiose	α -D-Glucose	n-Inositol	α -D-Lactose	Lactulose	Maltose	D-Mannitol	D-Mannose
C	D-Melibiose	β -Methyl-D-Glucoside	D-Psicose	D-Raffinose	L-Rhannose	D-Sorbitol	Sucrose	D-Trethalse	Turanose	Xylitol	Pyruvic Acid Methyl Ester	Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D	Acetic Acid	Cis-Aconitic Acid	Citric Acid	Formic Acid	D-Galactonic Acid Lactone	D-Gallacturonic Acid	D-Gluconic Acid	D-Glucosaminic Acid	AcidD-Glucuronic Acid	α -Hydroxybutyric Acid	β -Hydroxybutyric Acid	γ -Hydroxybutyric Acid
E	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	Itaconic Acid	α -Keto Butyric Acid	α -Keto Glutaric Acid	α -Keto Valeric Acid	D,L-Lactic Acid	Malonic Acid	Propionic Acid	Quinic Acid	D-Saccharic Acid	Sebacic Acid	Succinic Acid
F	Bromosuccinic Acid	Succinamic Acid	Glucuronamide	L-Alaninamide	D-Alanine	L-Alanine	L-Alanylglycine	L-Asparagine	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	Glycyl-L-Aspartic Acid	Glycyl-L-Glutamic Acid
G	L-Histidine	Hydroxy-L-Proline	L-Leucine	L-Omithine	L-Phenylallanine	L-Proline	L-Pyroglutamic Acid	D-Serine	L-Serine	L-Threonine	D,L-Carnitine	γ -Amino Butyric Acid
H	Urocanic Acid	Inosine	Uridine	Thymidine	Phenyethylamine	Putrescine	2-Aminoethanol	2,3-Butanediol	Glycerol	D,L- α -Glycerol Phosphate	α -D-Glucose-1-Phosphat	D-Glucose-5-Phosphate

Polymer Karbohydrat Ester Karboksylsyrer Brominerte kjemikalier Amider

Aminosyrer Aromatiske kjemikalier Aminer Alkoholer Fosforylerte kjemikalier

Kilde: (Garland & Mills 1991).

Vekst og generasjonstid

Tabell 7, absorbans måling ved 560 nm. Prøve 1-1, 2-1 og 1-3 er 1:1 fortynnet.

Prøve:	1-1	2-1	1-3	1-2	2-2
<u>Kontroll</u>	0,658	0,718	0,599	0,526	0,843
0,125 %	0,482	0,531	0,284	0,767	0,805
0,25 %	0,533	0,391	0,144	0,633	0,748
0,5 %	0,414	0,213	0,16	0,227	0

Tabell 8, antall bakterier (log) pr ml renkultur F ved hvert uttak (time), inkl. totaltall

Timer:	CFU										Totaltall	
	0	6	25,5	28,5	31,5	35	49	54,5	75,5	97	28,5	97
Kontroll	3,41	3,41	8,76	8,96	9,12	8,95	9,31	9,12	8,20	9,20	10,62	12,95
0,125 %	3,29	3,66	8,63	8,74	9,11	9,11	9,23	9,23	9,11	9,10	10,42	12,37
0,25 %	3,41	3,71	8,55	8,65	9,05	9,08	9,17	9,14	9,32	9,38	10,49	10,48
0,5 %	3,36	3,81	7,83	8,12	8,40	8,54	8,87	8,92	8,90	8,30	9,61	11,59
1 %	3,35	3,35	5,60	5,60	6,04	6,48	8,44	8,99	8,85	8,48	8,44	13,24
2 %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,43	5,12

Tabell 9, antall bakterier (log) pr anrikningskultur ved hvert uttak (timer), inkl. totaltall

Prøve	Såpekons.	CFU					Totaltall	
		0 time	24 timer	48 timer	72 timer	126 timer	24 timer	126 timer
1-3	0,125 %	4,78	9,26	9,35	9,51	9,66	10,76	11,3
	1 %	2,70	2,70	5,09	7,48	8,92	8,26	10,4
2-1	0,125 %	4,85	9,25	9,60	9,64	9,67	10,83	11,08
2-1	1 %	3,52	3,52	6,41	9,31	9,09	7,69	10,12
2-2	0,125 %	5,05	9,29	9,19	9,34	9,48	11,16	10,68
2-2	1 %	3,38	3,38	5,43	7,48	8,92	7,88	10,24

Nedbrytning av alkoholetoksilater i Remikraft 703

Tabell 10, AEO som prosent av innhold i ren såpe. (Bioforsk.)

Prøve	C9E3 AEO (m/z 294)	C9E4 AEO (m/z 338)	C9E5 AEO (m/z 382)	C9E6 AEO (m/z 426)	C9E7 AEO (m/z 470)	C9E8 AEO (m/z 514)	C10E3 AEO (m/z 308)	C10E4 AEO (m/z 352)	C10E5 AEO (m/z 396)	C10E6 AEO (m/z 440)	C10E7 AEO (m/z 484)	C10E8 AEO (m/z 528)	C11E3 AEO (m/z 322)	C11E4 AEO (m/z 366)	C11E5 AEO (m/z 410)	C11E6 AEO (m/z 454)	C11E7 AEO (m/z 498)
F 1% dag 0	0,800	0,871	0,909	0,937	0,978	0,988	0,737	0,798	0,856	0,927	0,977	0,992	0,712	0,778	0,829	0,908	0,953
F 0,25% dag 0	0,228	0,260	0,272	0,275	0,280	0,283	0,232	0,262	0,275	0,284	0,283	0,280	0,221	0,250	0,272	0,278	0,279
4-1 1% dag 0	0,844	0,900	0,930	0,959	1,005	1,022	0,770	0,816	0,857	0,921	0,972	0,992	0,710	0,737	0,837	0,890	0,937
4-1 0,25% dag 0	0,225	0,250	0,261	0,265	0,269	0,270	0,226	0,256	0,268	0,274	0,275	0,272	0,210	0,241	0,260	0,267	0,268
F 1%	0,773	0,830	0,860	0,881	0,930	0,944	0,701	0,764	0,794	0,865	0,912	0,941	0,653	0,701	0,766	0,834	0,870
F 0,25%	0,204	0,253	0,261	0,247	0,261	0,263	0,194	0,252	0,212	0,231	0,238	0,250	0,149	0,229	0,181	0,189	0,183
4-1 1%	0,386	0,860	0,724	0,851	0,924	0,960	0,207	0,742	0,513	0,712	0,837	0,916	0,945	0,555	0,357	0,533	0,688
4-1 0,25%	0,000	0,130	0,048	0,111	0,149	0,186	0,003	0,050	0,012	0,032	0,078	0,139	0,002	0,007	0,005	0,006	0,015
3-1 1%	0,019	0,014	0,326	0,404	0,566	0,784	0,000	0,000	0,088	0,099	0,250	0,552	0,000	0,000	0,012	0,015	0,058
3-1 0,25%	0,000	0,006	0,006	0,007	0,011	0,017	0,000	0,006	0,000	0,005	0,007	0,009	0,003	0,005	0,003	0,002	0,003
2-1 1%	0,314	0,671	0,567	0,601	0,644	0,755	0,211	0,489	0,352	0,392	0,313	0,463	0,131	0,234	0,212	0,149	0,492
2-1 0,25%	0,001	0,030	0,024	0,036	0,043	0,071	0,005	0,010	0,011	0,015	0,013	0,028	0,003	0,007	0,007	0,007	0,006
1-1 1%	0,720	0,837	0,789	0,804	0,842	0,906	0,619	0,718	0,626	0,629	0,622	0,748	0,501	0,562	0,458	0,362	0,264
1-1 0,25%	0,009	0,030	0,040	0,058	0,073	0,111	0,005	0,010	0,013	0,016	0,020	0,050	0,003	0,006	0,007	0,007	0,006
A 1%	0,721	0,779	0,795	0,811	0,846	0,850	0,581	0,696	0,736	0,787	0,823	0,829	0,468	0,621	0,704	0,744	0,782
A 0,25%	0,010	0,088	0,194	0,201	0,208	0,211	0,003	0,035	0,173	0,189	0,208	0,215	0,001	0,028	0,146	0,172	0,193
E 1%	0,758	0,829	0,786	0,779	0,808	0,861	0,655	0,730	0,669	0,626	0,649	0,754	0,505	0,567	0,540	0,420	0,373
E 0,25%	0,005	0,119	0,137	0,131	0,136	0,167	0,000	0,040	0,058	0,058	0,058	0,109	0,005	0,010	0,015	0,013	0,008
G 1%	0,459	0,817	0,738	0,732	0,773	0,829	0,249	0,647	0,597	0,576	0,608	0,712	0,077	0,352	0,467	0,362	0,321
G 0,25%	0,003	0,091	0,043	0,073	0,081	0,120	0,000	0,013	0,011	0,017	0,017	0,040	0,004	0,000	0,006	0,006	0,006
Ref medie	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ref 1%	0,976	0,934	0,920	0,945	0,977	0,981	0,859	0,825	0,837	0,880	0,923	0,939	0,752	0,733	0,807	0,845	0,884
Ref 0,25%	0,227	0,233	0,233	0,234	0,236	0,235	0,232	0,236	0,239	0,243	0,246	0,245	0,219	0,230	0,247	0,244	0,246

Tabell 11, gjennomsnitt av EO for hver C9-11 som prosent av innhold i ren såpe. (Bioforsk.)

Prøve	Snitt C9	Snitt C10	Snitt C11	Snitt total AEO
F 1% dag 0	0,914	0,881	0,836	0,877
F 0,25% dag 0	0,266	0,269	0,260	0,265
4-1 1% dag 0	0,943	0,888	0,822	0,885
4-1 0,25% dag 0	0,257	0,262	0,249	0,256
F 1%	0,870	0,829	0,765	0,821
F 0,25%	0,248	0,230	0,186	0,221
4-1 1%	0,784	0,654	0,616	0,685
4-1 0,25%	0,104	0,052	0,007	0,054
3-1 1%	0,352	0,165	0,017	0,178
3-1 0,25%	0,008	0,005	0,003	0,005
2-1 1%	0,592	0,370	0,244	0,402
2-1 0,25%	0,034	0,014	0,006	0,018
1-1 1%	0,816	0,660	0,429	0,635
1-1 0,25%	0,053	0,019	0,006	0,026
A 1%	0,800	0,742	0,664	0,735
A 0,25%	0,152	0,137	0,108	0,132
E 1%	0,804	0,681	0,481	0,655
E 0,25%	0,116	0,054	0,010	0,060
G 1%	0,725	0,565	0,316	0,535
G 0,25%	0,068	0,016	0,004	0,030
Ref medie	0,000	0,000	0,000	0,000
Ref 1%	0,956	0,877	0,804	0,879
Ref 0,25%	0,233	0,240	0,237	0,237

Gassanalyser

Tabell 12, gassanalyser 28.9.06

TCD	CO2		O2		N2	
Sted	Tid (min)	Areal	Tid (min)	Areal	Tid (min)	Areal
Luft	0,720	120,24	1,063	142400,71	1,455	538378,22
SK innløp	0,708	16877,59	1,078	13400,04	1,455	530803,37
SK barriere	0,705	14473,90	1,073	26017,84	1,444	584758,01
HB	0,727	14193,26	1,097	15139,70	1,474	525022,87
FID	METAN		METAN			
Sted	Tid (min)	Areal	Tid (min)	Areal		
Luft 1	0,454	668,57	2,594	2307,97		
SK innløp	0,454	11427,55	2,600	34743,76		
SK barriere	0,450	48080,03	2,597	153681,41		
HB	0,472	23963,3	2,620	74326,37		

Tabell 13, gassanalyser 8.3.07

TCD	CO2		O2		N2	
Sted	Tid (min)	Areal	Tid (min)	Areal	Tid (min)	Areal
Luft	0,722	105,01	1,059	141873,83	1,418	534050,58
SK innløp	0,729	18481,90	1,087	9614,42	1,425	578000,18
SK barriere	0,709	12061,09	1,065	9654,10	1,403	560484,54
HB	0,696	13478,59	1,053	9176,08	1,399	477222,18
FID	METAN		METAN			
Sted	Tid (min)	Areal	Tid (min)	Areal		
Luft	0,465	1503,24	2,538	4462,2		
SK innløp	0,461	3733328,66	2,468	14500065,9		
SK barriere	0,458	1768989,21	2,524	5655997,74		
HB	0,448	67854,76	2,506	212575,75		