

UNDERSØGELSER AF FOREKOMST OG  
AKTIVITET AF MARINE OLIENEDBRYDENDE  
MIKROORGANISMER VED VESTGRØNLAND



VANDKVALITETSINSTITUTTET ATV  
GRØNLANDS FISKERIUNDERSØGELSER

UNDERSØGELSER  
AF  
FOREKOMST OG AKTIVITET  
AF  
MARINE OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER  
VED  
VESTGRØNLAND

RAPPORT TIL MINISTERIET FOR GRØNLAND

SEPTEMBER 1979

*Nis Hansen og K. Krongaard Kristensen  
Vandkvalitetsinstituttet, ATV  
Agern Allé 11 - 2970 Hørsholm*

*og*

*Hanne Petersen  
Grønlands Fiskeriundersøgelser  
Jægersborg Allé 1 B - 2920 Charlottenlund*

	INDHOLDSFORTEGNELSE	SIDE
0	INDHOLDSFORTEGNELSE	
1.	RESUME	1
1.1	DANSK RESUME	1
1.2	SUMMARY	3
2.	INDLEDNING	5
2.1	BESKRIVELSE AF FARVAND	6
3.	METODER	9
3.1	INDSAMLING AF PRØVER	9
3.2	ANALYTISKE METODER	10
	3.2.1 Mikrobiologiske metoder	10
	3.2.2 Nedbrydelighedsforsøg	12
4.	RESULTATER	17
4.1	KVANTITATIVE UNDERSØGELSER OVER FOREKOMST AF TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM	17
4.2	KVALITATIVE UNDERSØGELSER AF ISOLEREDE, OLIE- NEDBRYDENDE BAKTERIESTAMMER	21
4.3	NEDBRYDELIGHEDSFORSØG	25
5.	DISKUSSION	35
5.1	KVANTITATIVE UNDERSØGELSER OVER FOREKOMST AF TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM	35
5.2	KVALITATIVE UNDERSØGELSER AF ISOLEREDE, OLIE- NEDBRYDENDE BAKTERIESTAMMER	39
5.3	NEDBRYDELIGHEDSFORSØG	41
6.	KONKLUSION	46
7.	LITTERATURLISTE	48
	BILAG 1 - 3	49

## TABELFORTEGNELSE

- TABEL 1    FORSØGSPLAN FOR NEDBRYDELIGHEDSFORSØG
- TABEL 2    KARAKTERISTIK AF DE ANVENDTE RÅOLIER
- TABEL 3    TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM I VAND OG SEDIMENT  
          INDSAMLET VED FÆRINGEHAVN DEN 18. SEPTEMBER 1978,  
          PODET DEN 19. SEPTEMBER.
- TABEL 4    TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM I VAND OG SEDIMENT  
          INDSAMLET VED KIGDLUT ILUAT DEN 22. SEPTEMBER 1978,  
          PODET DEN 23. SEPTEMBER.
- TABEL 5    TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM I VAND INDSAMLET VED  
          FYLLA BANKE DEN 1. JUNI OG 25. SEPTEMBER 1978, PODET  
          HENHOLDSVIS DEN 3. JUNI OG 28. SEPTEMBER.
- TABEL 6    TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM I SEDIMENT INDSAMLET  
          VED FYLLA BANKE DEN 1. JUNI OG 25. SEPTEMBER 1978,  
          PODET HENHOLDSVIS DEN 3. JUNI OG 28. SEPTEMBER.
- TABEL 7    OPRINDELSE AF ISOLEREDE BAKTERIESTAMMER
- TABEL 8    BIOKEMISKE UNDERSØGELSER AF GRAMPOSITIVE BAKTERIE-  
          STAMMER
- TABEL 9    BIOKEMISKE UNDERSØGELSER AF GRAMNEGATIVE BAKTERIE-  
          STAMMER
- TABEL 10    RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 1
- TABEL 11    RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 2
- TABEL 12    RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 3

TABEL 13	RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 4
TABEL 14	RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 5
TABEL 15	RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 6
TABEL 16	RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 7
TABEL 17	RESULTATER FRA NEDBRYDELIGHEDSFORSØG, SERIE 8
TABEL 18	RESULTATER FRA PRØVER TILSAT 0,2% FORMALIN
TABEL 19	OPDELING AF RESULTATER FOR TOTALKIM I VAND
TABEL 20	OPDELING AF RESULTATER FOR TOTALKIM I SEDIMENT
TABEL 21	OPDELING AF RESULTATER FOR OLIENEDBRYDERE I VAND
TABEL 22	OPDELING AF RESULTATER FOR OLIENEDBRYDERE I SEDIMENT
TABEL 23	MIKROBIOLOGISKE OG KEMISKE ÆNDRINGER UNDER NEDBRYDELIGHEDSFORSØG SOM FUNKTION AF TIDEN

## FIGURFORTEGNELSE

FIGUR 1	STATIONSKORT
---------	--------------

## 1. RESUME

### 1.1. DANSK RESUME

Som led i en række miljøundersøgelser omkring olieeftersforskningen ved Vestgrønland er der foretaget undersøgelser af de mikrobielle forhold i grønlandske farvande. De her beskrevne undersøgelser udgør anden del af et projekt og har til formål at undersøge, hvilke mikroorganismer der findes i området, mikroorganismernes udbredelse samt deres muligheder for at nedbryde olie i laboratoriet.

I projektets første del gennemførtes undersøgelser på tre kystnære lokaliteter. Resultaterne er beskrevet i en tidligere rapport. I de videre undersøgelser er to af disse lokaliteter undersøgt nærmere. Det drejer sig om Færingehavn som det mest olieforurenede område og Kigdlut Iluat som det mindst forurenede område. Desuden foretoges undersøgelser i det åbne havområde ud for Vestgrønland, Fylla banke, et område, som forventedes at være endnu mindre forurenede end Kigdlut Iluat. Undersøgelserne i det åbne hav udførtes i to perioder, dels i starten af juni og dels i slutningen af september 1978.

På vand- og sedimentprøver fra de tre områder er udført kvantitative og kvalitative mikrobiologiske undersøgelser. Undersøgelserne har vist følgende:

- såvel udenskærs som indenskærs forekommer der flere arter af olienedbrydende bakterier, som ved lave temperaturer og under marine forhold kan nedbryde olie,
- såvel totalkimtal som antal olienedbrydende bakterier er højest i Færingehavn, hvor der er olieforurening fra tankanlægget Polaroil,
- antallet af totalkim og olienedbrydende bakterier i vandfasen er generelt lavt i alle 3 undersøgte områder,
- i sedimenter fra Fylla banke er der fundet højere antal totalkim og olienedbrydende kim i juni end i september, hvorimod der ikke kunne konstateres forskel på kimindholdet i vandprøver.

- der er ikke fundet kendte human- eller fiskepatogene bakterier.

Yderligere er udført laboratorieundersøgelser til belysning af den olienedbrydende evne hos den naturlige mikroflora i det åbne havområde, hvor olieeftersforskningen i Vestgrønland foregik. Forskellige faktorerers indflydelse på nedbrydningen undersøgte, idet nedbrydningen fulgtes gennem 19 uger ved hjælp af mikrobiologiske og kemiske analyser. Nedbrydelighedsundersøgelserne har vist følgende:

- tilstedeværelsen af sediment virker stærkt fremmende på nedbrydningen af olie,
- en temperaturstigning fra 4°C til 20°C virker som ventet fremmende på nedbrydningen, men olie nedbrydes ved 4°C, processen foregår blot langsommere,
- en forøgelse af oliekoncentrationen fra 0,05% til 0,5% virkede i forsøgets start hæmmende på nedbrydningen (toxisk effekt ?), hvorimod påvirkningen var ringe senere i forsøget,
- tilsætning af uorganiske næringssalte virker stærkt fremmende på nedbrydningen,
- som et mål for olienedbrydningen har bestemmelsen af total kim vist sig mere velegnet end bestemmelsen af olienedbrydende kim,
- organiske buffere som for eksempel TRIS-buffer er ikke anvendelige ved nedbrydelighedsforsøg med langsomt nedbrydelige stoffer, idet organiske buffere synes at kunne indgå som kulstof- og energikilde i et forsøg, hvis forudsætning netop er, at olien selv udgør den eneste kulstof- og energikilde.

## 1.2 SUMMARY

As a part of environmental studies initiated in connection with oil exploration off West Greenland, investigations of the microbiological conditions in Greenland waters were carried out. The studies reported here are the second part of a project with the aim of determining which microorganisms are present, their distribution and their ability to degrade oil in laboratory experiments.

In the previous studies investigations were carried out in three coastal areas. The results are described in a previous report. In the present study two of these areas were further investigated. The two areas were Føringehavn being the locality most exposed to oil and Kigdlut Iluat being the one least exposed. Furthermore investigations were carried out in the open sea off West Greenland, Fylla banke, an area expected to be the least exposed of the areas investigated in this study. The studies in the open sea were performed over two periods, in the beginning of June and at the end of September 1978.

Quantitative and qualitative microbiological examinations were performed on water and sediment samples from the three areas. The examinations have shown that:

- several species of bacteria with the ability of degrading oil in the sea at low temperatures were found in the open sea as well as in the coastal areas,
- the total number of germs as well as the number of oil degrading bacteria were larger in Føringehavn, having some oil pollution from an oil tank plant, Polaroil,
- the total number of germs and the number of oil degrading bacteria in the seawater samples were generally low in the three areas studied,



- in sediment samples from the open sea the total number of germs and the number of oil degrading bacteria were found to be larger in June than in September, whereas no difference was found in the water samples,
- human or fish pathogenous bacteria have not been found.

Laboratory studies were carried out to examine the oil degrading ability of the natural microflora (i.e. in seawater and sediment) in the open sea, where the oil explorations off West Greenland were carried out. The influence of different factors on the biodegradation was examined, as the degradation was followed during a period of 19 weeks by microbiological and chemical analysis. The degradation studies have shown that:

- the presence of sediment facilitates the degradation of oil,
- an increase in temperature from 4°C to 20°C facilitates the degradation as was expected, but oil is degraded even at 4°C,
- an increase in oil concentration from 0,05 to 0,5 per cent inhibits the growth of microorganisms in the beginning of the incubation period,
- the addition of inorganic nutrients strongly facilitates the degradation,
- the determination of the total number of germs seems to be a better measurement for degradation of oil than the determination of oil degrading microorganisms,
- organic buffers like TRIS-buffers must be avoided in degradation studies of relatively undegradable substances, as organic buffers seem to act as a carbon source where the oil is assumed to be the only carbon source.

## 2. INDLEDNING

I forbindelse med, at der i 1976 blev indledt boringer efter olie i vestgrønlandske farvande, blev der iværksat en række miljøundersøgelser i området. Med hensyn til en generel beskrivelse af baggrunden for disse undersøgelser og af det område, hvor de er foretaget, henvises til rapporten "Hydrocarboner i marine organismer og sedimenter ved Vestgrønland" /1/.

Formålet med undersøgelserne har været at undersøge, hvilke mikroorganismer der findes i grønlandske farvande, samt disses evne til at nedbryde hydrocarboner. Nærværende rapport skal ses i sammenhæng med rapporten "Olienedbrydende" mikroorganismer i Færingehavn, Malenebugten og Kigdlut Iluat /2/, der beskriver kvantitative og kvalitative undersøgelser i vand og sediment af mikroorganismer på de nævnte kystnære lokaliteter.

I nærværende rapport er undersøgelserne ligesom i 1977 foretaget på lokaliteterne Færingehavn og Kigdlut Iluat. Indsamlingen er dog foretaget på et andet tidspunkt for at undersøge årstidsvariationen. Desuden er der inddraget et nyt område, idet en lokalitet i det åbne havområde er undersøgt på to forskellige årstider.

Rapporten indeholder desuden resultatet af laboratorieforsøg, hvor mikroorganismer, indsamlet i vand og sediment fra grønlandske farvande, er blevet undersøgt for deres evne til at nedbryde olie under forskellige forsøgsbetingelser.

Det er dels blevet undersøgt, om de enkelte arter af mikroorganismer er i stand til at nedbryde forskellige oliekomponenter, og dels er nedbrydningen af olie i vand- og sedimentprøver med den naturlige mikroorganismepopulation blevet undersøgt ved forskellige temperaturer og for forskellige typer af olie. Nedbrydningen af olie i disse forsøg er fulgt både mikrobiologisk og kemisk.

De her beskrevne undersøgelser er gennemført i samarbejde mellem Vandkvalitetsinstituttet (VKI) og Grønlands Fiskeriundersøgelser (GF) og finansieres af GF.

De må indtil videre betragtes som afslutning på det projekt, som belyser de mikrobielle forhold i grønlandske farvande med henblik på nedbrydning af oliekomponenter.

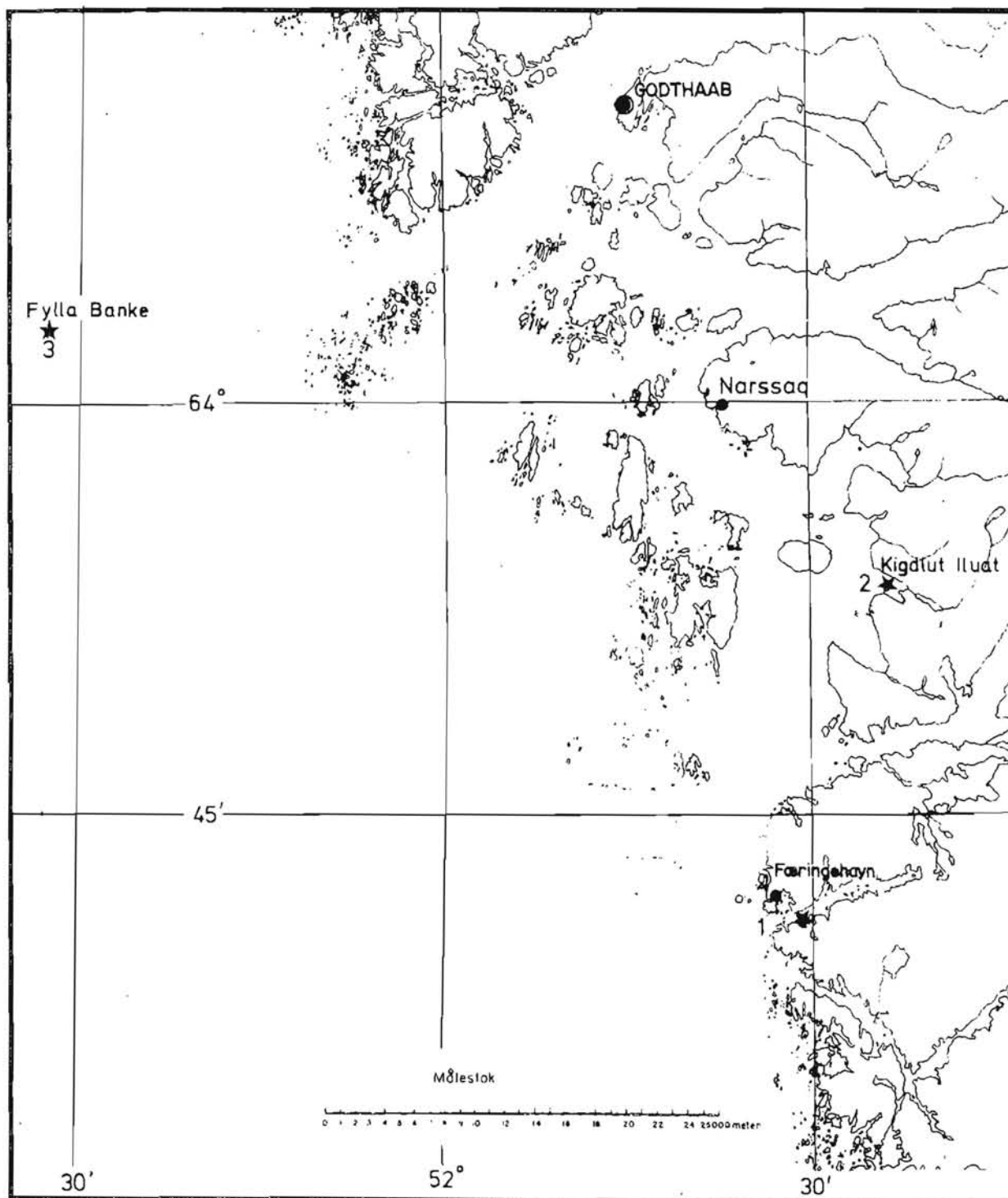
## 2.1 BESKRIVELSE AF FARVAND

Prøverne blev indsamlet både i kystnære og åbne havområder. De to kystnære lokaliteter er identiske med to af de lokaliteter, der blev benyttet til de første indsamlinger. Fig. 1 viser de undersøgte lokaliteters beliggenhed.

Lokalitet 1: Færingehavn, Kangerdluarssoruseq ( $63^{\circ} 41' N. 51^{\circ} 31' V.$ ). Færingehavn er beliggende ca. 56 km syd for Godthåb i en mindre fjord, Kangerdluarssoruseq (se figur 1). På denne fjords sydlige side har der gennem flere år været placeret et olietankanlæg (POLAROIL), hvorfra olieforurening jævnligt har fundet sted i forbindelse med bunkring af fiskefartøjer, tankskibe og andre skibe og i forbindelse med udtømning af tankskibenes ballastvand ved anløb til havnen.

Området har således været udsat for olietilførsel gennem flere år, og prøver udtaget i dette område vil kunne give information, om der eventuelt er udviklet en mikroflora domineret af "olie-nedbrydere". Prøverne blev udtaget i umiddelbar nærhed af POLAROIL's kaj. Sedimentet i området bestod af sand med organisk materiale, og vanddybden varierede mellem 11 og 90 meter.

Lokalitet 2: Kigdlut Iluat ( $63^{\circ} 53' N. 51^{\circ} 24' V.$ ). Kigdlut Iluat er beliggende 35 km syd for Godthåb. Området er ubeboet, og bugten må anses for at være ubelastet af olieforurening. Prøver taget i dette område må antages at kunne give information om, hvor stor en del af mikrofloraen, der vil være i stand til at nedbryde hydrocarboner fra råolie, når der i området kun er hydrocarboner af biogen oprindelse til stede. Prøverne er udtaget på dybder mellem 12 og 83 meter. Sedimentet bestod af sand og silt.



Figur 1. Stationskort

Lokalitet 1 : Føringehavn

Lokalitet 2 : Kigdlut Iluat

Lokalitet 3 : Fylla banke

Lokalitet 3: De prøver, der repræsenterer et åbent havområde, er indsamlet på kanten af Fylla banke (fig. 1). Prøverne blev indsamlet på kanten, hvor sedimentet bestod af sand med varierende mængde skalgrus. Prøverne blev indsamlet indenfor et område på 1 sømil<sup>2</sup> omkring positionen 64°04' N, 52°33' V på vanddybder fra 63 - 70 meter i en afstand ca. 25 km fra kysten, da det formodedes, at der i denne afstand ikke vil være nogen påvirkning fra landområder.

### 3. METODER

#### 3.1 INDSAMLING AF PRØVER

Indsamlingen af prøver blev foretaget fra Grønlands Fiskeriundersøgelses skib ADOLF JENSEN to gange på Fylla banke i henholdsvis juni og september måned og i Færingehavn i september måned. Prøverne fra Kigdlut Iluat blev indsamlet fra kutteren TORNAQ i september.

Alle vandprøver blev indsamlet i 1 meters dybde med Knudsenvandhenter, der blev steriliseret før brug. Vandet blev overført til sterile plastflasker. Temperatur og saltholdighed blev målt i 1 meters dybde.

Sedimentprøverne blev indsamlet med lysekrone-bundhenter, hvis plastikrør blev steriliseret før brug. De to øverste cm af sedimentsøjlen blev overført til en steril plastikbeholder.

Både vand og sediment blev opbevaret ved temperaturer mellem 1° og 4°C indtil podningen fandt sted. Dette skete på VKI's laboratorium i Hørsholm for prøverne fra Fylla banke, medens prøverne fra Færingehavn og Kigdlut Iluat blev podet på Fiskeri-biologisk Laboratorium i Godthåb.

## 3.2 ANALYTISKE METODER

Samtlige prøver underkastedes mikrobiologiske undersøgelser efter metoder, som beskrives i afsnit 3.2.1.

Desuden udførtes nedbrydelighedsforsøg i laboratoriet, idet der hertil benyttedes vand og sediment indsamlet i de åbne havområder ved Fylla banke. Ved laboratorieforsøgene fulgtes nedbrydningen ved mikrobiologiske og kemiske analyser. Metodikken ved nedbrydelighedsforsøgene beskrives i afsnit 3.2.2.

### 3.2.1 Mikrobiologiske metoder

#### Tælling af totalkim på agarplader

Totalkim er bestemt på marinagar (Difco Bacto-marine agar 2216). Substratet fremstilledes efter formel oprindeligt angivet af Zobell. Sammensætningen fremgår af bilag 1.

Ved undersøgelsen af sediment og vand fremstilledes fortyndinger af undersøgelsesmaterialer, så der opnåedes fortyndinger på  $10^{-1}$  -  $10^{-6}$ . Som fortyndingsvæske anvendtes fysiologisk saltopløsning. Fra disse fortyndinger podedes i petriskåle, og inocula repræsenterende de anvendte fortyndinger overhældtes med smeltet  $45^{\circ}$  varm marinagar. Inkubationstiden var 7 dage ved  $20^{\circ}\text{C}$ .

Metoden er benyttet i den tidligere undersøgelse / 2 /.

#### Tælling af olienedbrydende mikroorganismer ved MPN-metode

Olienedbrydende mikroorganismer er bestemt under anvendelse af MPN-metode. Substratet er en modifikation af Colwells medium / 3 /, idet indholdet af  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  er nedsat for at forebygge udfældninger af magnesiumphosphat. Substratets sammensætning fremgår af bilag 2.

Substratet fordeltes på reagensglas med skruelåg med 5 ml substrat pr. glas. Der tilsattes med mikropipette 50  $\mu\text{l}$  olie pr. glas, svarende til 1% olie.

Der anvendtes Shell Vitrea oil 27, en let smøreolie fri for dertogter. Olien har følgende sammensætning:

ca. 70% alkaner

ca. 24% cycloalkaner

ca. 6% aromater.

Tilsæede glas henstod i 2½ måned i rysteapparat ved 15 °C. Hver fortynding var repræsenteret med 3 rør (triplicate-opsætning). Rørene aflæstes en gang ugentligt.

Metoden er benyttet i den tidligere undersøgelse /2/.

Kvalitative bestemmelser vedrørende isolerede olienedbrydende bakterier.-----

Bakteriestammer blev isoleret fra medier med olie som eneste kulstofkilde. Stammer er isoleret såvel fra de åbne havområder ved Fylla banke som indenskærs ved Færingehavn og Kigdlut Iluat. En del stammer er isoleret fra nedbrydelighedsforsøgene. Hovedparten hidrører fra sediment, dog med enkelte stammer isoleret fra vandfasen. Stammerne er isoleret fra prøver udtaget såvel juni 1978 som september 1978.

De isolerede bakteriestammer er undersøgt biokemisk for at opnå en initial biokemisk-taxonomisk vurdering, og specielt med henblik på at dokumentere, hvorvidt olienedbrydende fiskepatogene eller humanpatogene bakterier kunne påvises i de åbne havområder.

Biokemisk-taxonomiske undersøgelser er udført ved hjælp af følgende tests:

Gramfarvning, hæmolyse, pigmentering, katalase, cytochrom oxidase, tween 20, tween 80, gelatine, lecitinase, O/F-test, Simmon's citrat, bevægelighed (S.I.M.), H<sub>2</sub>S (S.I.M.), indol (S.I.M.), 1% tryptone uden salttilsætning, 1% tryptone med 4% NaCl, 1% tryptone med 7% NaCl, Voges Proskauer, arginin (Møller), lysin (Møller), urinstof, nitratreduktion, arabinose, cellobiose, laktose,



sucrose, glycerol, stivelse, xylose, chitin, kødvand med 1% NaCl ved 5°C, kødvand med 1% NaCl ved 10°C, kødvand med 1% NaCl ved 15°C, kødvand med 1% NaCl ved 30°C.

Alle aflæsninger af reaktioner er afsluttet senest 7. dagen med daglige aflæsninger af ændringer i reaktioner. Hvor ikke andet er anført, er den anvendte temperatur 20°C.

### 3.2.2 Nedbrydelighedsforsøg

Nedbrydelighedsforsøgene udførtes som rystebord-forsøg i laboratoriet.

Ved forsøgene undersøgte 5 faktorerers indflydelse på den mikrobielle nedbrydning af olie. Disse faktorer er:

- A: Sediment
- B: Olietypen
- C: Temperaturen
- D: Oliekoncentrationen
- E: Næringssalte

Forsøgene blev tilrettelagt efter statistisk forsøgsplan for et partielt  $2^k$ -faktorforsøg. Forsøgsplanen og beregningerne er kort gennemgået i bilag 3, og for en nøjere gennemgang henvises til /4/. Den benyttede forsøgsplan gør det muligt samtidigt at bestemme faktorernes indflydelse. Faktorernes rækkefølge er valgt således, at der opnås den størst mulige information om de enkelte faktorerers indflydelse. Ifølge forsøgsplanen kan hver faktor have 2 "værdier". For ovenstående faktorer var disse "værdier" følgende:

- A:  $A_1$  - vand uden sediment  
 $A_2$  - vand med sediment
- B:  $B_1$  - Ekofisk råolie  
 $B_2$  - Iran Light råolie
- C:  $C_1$  - 4°C  
 $C_2$  - 20°C

- D: D<sub>1</sub> - 0,05% olie  
D<sub>2</sub> - 0,5% olie  
E: E<sub>1</sub> - uden næringssalte  
E<sub>2</sub> - med næringssalte

I tabellerne B1 - B3 i bilag 3 er faktorernes effekt på olienedbrydningen beregnet som talstørrelser. Disse tal angiver, hvilken virkning en ændring af en faktor fra den ene "værdi" (f.eks. A<sub>1</sub>) til den anden "værdi" (f.eks. A<sub>2</sub>) vil have på den pågældende analysevariabel.

Der startedes 8 forsøgsserier, idet hver "værdi" for de 5 faktorer optrådte i 4 serier. 4 serier kørtes ved 4°C og 4 serier ved 20°C, til 4 serier sattes ingen næringssalte og til 4 serier sattes næringssalte, etc. Forsøgene blev opstillet efter skemaet i tabel 1, hvor faktorernes "værdi" er angivet for de 8 forsøgsserier.

Faktor Serie	A	B	C	D	E
1	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>
2	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>1</sub>
3	A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>
4	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>
5	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>
6	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>
7	A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>
8	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>1</sub>

Tabel 1. Forsøgsplan for nedbrydelighedsforsøg.

Det benyttede vand og sediment var indsamlet i de åbne havområder ved Fylla banke, og for såvel vand som sediment var der tale om blandingsprøver. Prøverne indsamledes den 1. juni 1978, og forsøget startedes den 6. juni.

En karakteristik af de anvendte råolier er givet i tabel 2.

Crude oil		EKOFISK CRUDE (Norway)	IRANIAN LIGHT CRUDE (Iran)
Specific gravity	15/4 °C	0.839	0.855
Kin. visc. at 50 °F	cSt	12.7	14.3
Kin. visc. at 100 °F	cSt	4.62	6.2
Sulphur	% wt	0.17	1.4
Pour point (ASTM max.)	°C	-9	-15
Total acid number	mg KOH/g	0.08	0.10

Tabel 2. Karakteristik af de anvendte råolier /5/.

For at tilnærme undersøgelserne de naturlige forhold fjernedes de mest flygtige komponenter fra råolien, inden forsøgene startedes. Disse komponenter er de mest akut toksiske og ville kunne betyde en kraftig hæmning af mikrofloraen ved forsøgets start, en hæmning der ikke ville have betydning under naturlige forhold, hvor de flygtige komponenter vil fjernes under weathering processerne.

Den simulerede weathering af råolien udførtes som følger:

Olie og ionbyttet vand blandedes i en flaske med perforeret låg i forholdet 1:10, og flasken anbragtes i 3 dage på rystebord ved ca. 22 °C. For begge olietyper fjernedes 24% af olien ved denne behandling. Den tilbageblevne råolie benyttedes ved forsøgene.

Oliekoncentrationen i forsøgene var valgt ud fra erfaringer fra nedbrydelighedsundersøgelser udført i forbindelse med et olie-spild i Melville bugten i august 1977 /6/. Disse forsøg udførtes med 0,5% olie, og resultaterne tydede på, at en mindre oliemængde ville gøre en eventuel nedbrydning lettere at detektere ved kemiske analyser.

Næringssaltene blev tilsat som ammoniumnitrat i koncentrationen 1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  pr. liter og fosfatbuffer (pH 7,5) i en koncentration svarende til ca. 0,6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pr. liter.

I nærværende forsøg er anvendt fosfatbuffer i stedet for organiske buffere, som for eksempel TRIS-buffer som eventuelt kunne udgøre en falsk og uønsket kulstof- og energikilde. I initiale forsøg på Vandkvalitetsinstituttet blev det eftervist, at TRIS-buffer i den rekommenderede tilsætning (12 g/liter) tilsat Colwell-substrat uden andre kulstofkilder kunne resultere i en stigning i kimal af en olienedbrydende teststamme fra  $10^6$ /ml til  $10^8$ /ml efter 4 uger. Kontrolforsøg uden TRIS-tilsætning udviste konstante kimal i forsøgsperioden /7/.

På basis af nærværende undersøgelse må der advares stærkt mod anvendelse af tris-buffer, idet dette stof eventuelt kan udnyttes af bakterier før eller parallelt med det stof, hvis nedbrydelighed ønskes undersøgt.

Forsøgene udførtes i Erlenmeyerkolber. For hver forsøgsserie blev fremstillet blandinger i én 1 liter kolbe og otte 100 ml kolber. Literkolben benyttedes til de mikrobiologiske undersøgelser, der således alle udførtes på den samme kolbe. Startrumfanget var ca. 350 ml vand og 50 g sediment. For hver forsøgsserie medtoges en kontrolkolbe til de mikrobiologiske analyser. Kontrollen var uden tilsat olie, men ellers identisk med den tilsvarende forsøgskolbe.

De otte 100 ml kolber benyttedes til de kemiske analyser, idet der ved hver analyse benyttedes én kolbe. Mængderne i hver kolbe var 50 ml vand og 10 g sediment. Som kontrol ved de kemiske analyser benyttedes kolber med olie og 0,2% formalin.

Formalin standser den bakterielle vækst, og kemisk analyse

af disse kolbers indhold vil derfor afspejle de fysisk-kemiske ændringer, der har fundet sted i forsøgsperioden, mens ændringer forårsaget af mikrobiel aktivitet elimineres.

Der udtoges prøver ved forsøgets start og efter 1, 2, 3, 5, 8, 12 og 19 uger, og prøverne underkastedes mikrobiologiske og kemiske analyser.

De mikrobiologiske analyser omfattede bestemmelse af totalalkim og olienedbrydende mikroorganismer ved metoderne anført i afsnit 3.2.1.

De kemiske analyser omfattede en bestemmelse af mængden af total olie samt af  $\frac{n-C_{17}}{\text{pristan}}$  - og  $\frac{n-C_{18}}{\text{phytan}}$  - forholdene. De sidstnævnte forhold kan benyttes som en indikation på mikrobiel nedbrydning af olien, idet n-alkanerne  $n-C_{17}$  og  $n-C_{18}$  nedbrydes hurtigere end de forgrenede alkaner pristan og phytan.

Analyser udførtes som følger:

Hele forsøgskolbens indhold af vand, olie samt eventuelt sediment ekstraheredes tre gange med 1,1,1-trichlorethan. Den kombinerede ekstrakt fortyndedes til 20 ml med trichlorethan. Nogle få mikroliter anvendtes til gaschromatografisk analyse. Den gaschromatografiske analyse udførtes på en Hewlett Packard model 5830 A med flammeionisationsdetektor (FID). Der benyttedes en SCOT kolonne med 53.000 teoretiske bunde, stationær fase: OV 101. Ovntemperaturen programmeredes fra 85 °C til 275 °C med 4 °C/min. Såvel alkaner som aromater og cycloalkaner medtages, idet hydrocarboner i kogepunktsintervallet for alkanerne  $C_{12}$  -  $C_{36}$  medbestemmes. Ved bestemmelsen af det totale olieindhold benyttedes som reference den råolie, der blev tilsat ved forsøgets start, det vil sige råolien efter den simulerede weathering.

## 4. RESULTATER

### 4.1 KVANTITATIVE UNDERSØGELSER OVER FOREKOMST AF TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM

I tabellerne 3-6 er anført analyseresultaterne fra bestemmelsen af totalkim og olienedbrydende kim. Tabel 3 og 4 omfatter resultaterne fra de kystnære områder Færingehavn og Kigdlut Iluat, mens tabel 5 og 6 omfatter resultaterne fra de åbne havområder ved Fylla banke.

Prøve nr	Prøvens art	Totalkim pr ml/pr g	Olienedbrydende kim pr ml/ pr g	Temp. °C	Saltholdighed, ‰
1	Vand	22	9,3	4,3	29,98
2	"	79	4,3	4,3	30,03
3	"	72	4,3	4,3	29,92
4	"	6	0,4	3,7	30,40
5	"	154	0,9	5,3	29,34
6	"	177	0,9	5,0	29,54
7	"	46	-	5,1	29,52
8	Sediment	1070	1,1		
9	"	10800	1,1		
10	"	4800	≥ 240		
11	"	20	1,5		
12	"	20	1,1		
13	"	10800	110		
14	"	137	2,1		

Tabel 3. Totalkim og olienedbrydende kim i vand og sediment indsamlet ved Færingehavn den 18. september 1978. Podet d. 19. september.

Prøve nr.	Prøvens art	Totalkim pr ml/pr g	Olienedbrydende kim pr ml/ pr g	Temp. °C	Saltholdighed, ‰
15	Vand	2	0,4	3,9	30,74
16	"	< 1	2,3	3,9	30,59
17	"	2	< 0,3	4,0	30,75
18	"	3	< 0,3	4,1	30,61
19	"	4	0,9	4,1	30,41
20	"	4	0,9	3,8	30,74
21	"	120	24	4,2	30,35
22	Sediment	68	2,3		
23	"	5	2,3		
24	"	282	0,4		
25	"	98	0,4		
26	"	75	15		
27	"	81	0,3		
28	"	78	2,0		

Tabel 4. Totalkim og olienedbrydende kim i vand og sediment indsamlet ved Kigdlut Iluat den 22. september 1978. Podet d. 23. september.

Prøve nr	Prøvetagningsdato	Totalkim pr ml/pr g	Olienedbrydende kim pr ml/ pr g	Temp °C	Saltholdighed, ‰
29	1/6	15	0,09		
30	"	4	0,09		
31	"	3	0,04		
32	"	1	0,04		
33	"	12	0,09		
34	"	1	0,09		
35	"	< 1	0,09		
36	"	12	< 0,03	ca. 1,0*	ca. 33,33
37	"	6	1,5		
38	"	< 1	< 0,03		
39	"	9	0,09		
40	"	< 1	< 0,03		
41	"	4	< 0,03		
42	"	12	< 0,03		
43	"	1	0,04		
44	25/9	42	< 0,03	2,6	31.51
45	"	11	0,04	2,5	31,50
46	"	2	< 0,03	2,6	31,56
47	"	7	< 0,03	2,6	31,49
48	"	4	< 0,03	-	31,50
49	"	4	< 0,03	-	31,60
50	"	4	< 0,03	-	31,50
51	"	< 1	< 0,03	-	31,50
52	"	1	0,04	-	31,50
53	"	4	< 0,03	-	31,50
54	"	1	< 0,03	-	31,51
55	"	2	< 0,03	-	31,55
56	"	3	< 0,03	-	31,52
57	"	1	< 0,03	-	31,50
58	"	2	< 0,03	-	-

\* Temperatur og salinitet målt 4 dage senere i samme område.

Tabel 5. Totalkim og olienedbrydende kim i vand indsamlet ved Fylla banke den 1. juni og 25. september 1978. Podet henholdsvis den 3. juni og 28. september.



Prøve nr	Prøvetagningsdato	Totalkim pr. g	Olienedbrydende kim pr. g
59	1/6	26	110
60	"	200	110
61	"	24.600	46
62	"	54	46
63	"	5.200	15
64	"	10	46
65	"	4.900	9,3
66	"	420	46
67	"	1.380	24
68	"	104	9,3
69	"	290	4,3
70	"	1.940	4,3
71	"	80	0,7
72	"	34.800	0,7
73	"	80	< 0,3
74	25/9	100	0,9
75	"	80	0,4
76	"	150	1,5
77	"	1.020	4,3
78	"	30	2,3
79	"	350	0,7
80	"	50	0,9
81	"	60	0,4
82	"	620	0,9
83	"	400	0,9
84	"	270	2,3
85	"	140	4,3
86	"	10	2,3
87	"	50	2,1
88	"	80	0,9

Tabel 6. Totalkim og olienedbrydende kim i sediment indsamlet ved Fylla banke den 1. juni og 25. september 1978. Podet henholdsvis den 3. juni og 28. september.

## 4.2 KVALITATIVE UNDERSØGELSER AF ISOLEREDE, OLIENEDBRYDENDE BAKTERIESTAMMER

I tabel 7 er anført de 70 bakteriestammer, som er isoleret fra medier med olie som eneste kulstofkilde.

De anførte bakteriestammer er undersøgt ved biokemiske tests, og resultaterne heraf er anført i tabellerne 8 og 9, hvor grampositive bakterier er anført i tabel 8 og gramnegative i tabel 9.

STAMME NR	LOKALITET	PRØVETAGN. DATO	PRØVENS ART	PRØVE NR
5	Fylla banke	1/6-78	Sediment	60
7	"	"	"	61
13	"	"	"	65
18	"	"	"	69
51	"	"	nedbr.forsøg m/sediment	eksper. serie 6
72	"	"	Sediment	66
121	"	"	"	65
125	"	"	"	67
242	"	"	nedbr.forsøg m/sediment	kontrol, serie 6
297	"	"	"	eksper. serie 8
530	"	"	Sediment	59
531	"	"	"	59
532	"	"	"	59
533	"	"	"	59
534	"	"	"	59
536	"	"	"	60
540	"	"	"	63
541	"	"	"	63
543	"	"	"	64
544	"	"	"	64
545	"	"	"	64
546	"	"	"	65
548	"	"	"	65
549	"	"	"	65
553	"	"	"	67
555	"	"	"	67
556	"	"	"	68
557	"	"	"	68
559	"	"	"	69
560	"	"	"	69
561	"	"	"	69
562	"	"	"	69
564	"	"	"	70

Tabel 7. (fortsættes)

STAMME NR	LOKALITET	PRØVETAGN DATO	PRØVENS ART	PRØVE NR
565	Fylla banke	1/6-78	Sediment	71
566	"	"	"	71
617	"	"	nedbr.forsøg m/ vand	eksper. serie 3
619	"	"	"	" " 3
621	"	"	"	" " 3
624	"	"	"	" " 3
625a	"	"	nedbr.forsøg m/sediment	" " 4
627	"	"	"	" " 4
629	"	"	"	" " 4
644	"	"	"	" " 6
647	"	"	"	" " 6
655	"	"	"	" " 8
659	"	"	"	" " 8
660	"	"	"	" " 8
703	"	"	Sediment	59
704	"	"	"	60
720	"	"	"	64
725	"	"	"	65
728	"	"	"	66
731	"	"	"	66
737	"	"	"	68
738	"	"	"	68
740	"	"	"	69
744	"	"	"	70
803	"	"	Vand	34
808	"	"	"	37
809	"	"	"	37
1001 a	Føringehavn	18/9-78	sediment	10
1002	"	"	"	11
1006 b	Kigdlut Iluat	22/9-78	"	26
1007 a	"	"	"	28
1008 b	Føringehavn	18/9-78	vand	1
1009 b	"	"	"	2
1012	Kigdlut Iluat	22/9-78	"	15
1013 a	"	"	"	16
1017 b	Fylla banke	25/9-78	sediment	79
1019 b	"	"	"	84

Tabel 7. Oprindelse af isolerede bakteriestammer.

Stamme nr.	Gramfarvning	Hemolyse	Pigment	Katalase	Cytochrom oxydase	Tween 20	Tween 80	Gelatine	O/F - Test Glycose	O/F - Test Mannitol	Bevægelighed S.I.M.	H <sub>2</sub> O S.I.M.	Indol S.I.M.	1% tryptone	1% tryptone + 4% NaCl	1% tryptone + 7% NaCl	V.P.	Arginin	NO <sub>3</sub>	Kødvand + 1% NaCl v. 5°C	Kødvand + 1% NaCl v. 10°C	Kødvand + 1% NaCl v. 15°C	Kødvand + 1% NaCl v. 30°C	Urinstof	Lecitinase
5	G + stav	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
7	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
13	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
18	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
51	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
72	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
121	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
125	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
242	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
297	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
530	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
531	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
532	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
533	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
534	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
536	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
540	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
541	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
543	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
544	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
545	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
546	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
548	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
549	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
553	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
555	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
556	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
557	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
559	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
560	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
561	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
562	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	M	-
564	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
565	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
566	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
703	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
704	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
720	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
725	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
728	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
731	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
737	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
738	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
740	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
744	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
803	"	-	Rød +	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
1001a	"	-	-	M	M	-	-	-	-	F	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	M

M: test ikke udført  
F: fermentativ

Tabel 8. Biokemiske undersøgelser af grampositive bakteriestammer.

Stamme nr.	Gramfarvning	Rennolyse	Pigment	Pteridin Fglisobhed	Katalase	Cytochrom oxidase	Tween 20	Tween 80	Gelatine	Lecitinase	O/P - Test	Simmon's citrat S.I.M.	Bevsgelighed S.I.M.	H <sub>2</sub> S S.I.M.	Indol S.I.M.	1% tryptone + 4% NaCl	1% tryptone + 7% NaCl
617	G-Stav	+	-	-	+	+	+	+	-	-	M	+	-	-	-	(-)	+
619	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	M	+	-	-	-	(-)	+
621	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	M	+	-	-	-	(-)	+
624	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	(-)	-	-	-	+
625a	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	-	-	-	-	+
627	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	-	-	-	-	+
629	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	-	-	-	-	+
644	"	+	-	-	+	+	+	+	(+)	-	gl-	-	(+)	-	-	-	+
647	"	+	-	-	+	+	+	+	(-)	-	gl-	-	-	-	-	-	+
655	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	-	-	-	-	+
653	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	-	-	-	-	+
660	"	+	-	-	+	+	+	+	-	-	gl-	-	-	-	-	-	+
808	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
809	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1002	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	(+)	-	-	(-)	-	+
1006b	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1007a	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1008b	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1009b	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1012	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	(+)	+
1013a	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1017b	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+
1019b	"	+	-	-	+	+	+	+	M	-	gl-	-	-	-	-	-	+

Stamme nr.	V.P.	Arginin	Lysin	Urinatof	NO <sub>3</sub>	Arabinose	Cellobiose	Laktose	Svrose	Glycerol	Stivelse	Xylose	Chitin	Rød vand + 1% NaCl v. 5°C.	Rød vand + 1% NaCl v. 10°C.	Rød vand + 1% NaCl v. 15°C.	Rød vand + 1% NaCl v. 30°C.
617	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
619	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
621	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
624	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
625a	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
627	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
629	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
644	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
647	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
655	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
659	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
660	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
803	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
809	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1002	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1006b	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1007a	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1008b	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1009b	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1012	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1013a	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1017b	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
1019b	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+

M : test ikke udført  
 S : sensitiv  
 F : fermentativ  
 gl- : glucosenegativ  
 (+) : svag reaktion

Tabel 9. Biokemiske undersøgelser af gramnegative bakteriestammer.

### 4.3 NEDBRYDELIGHEDSFORSØG

I tabellerne 10 - 17 er anført resultaterne fra de 8 forsøgsserier i nedbrydelighedsforsøget. I hver tabel er samlet såvel de mikrobiologiske som de kemiske analyseresultater for en enkelt forsøgsserie.

Betegnelsen "total olie" omfatter såvel alkaner som aromater og cycloalkaner og vil således uspecifikt afspejle ændringen af olien. Forholdene  $n\text{-C}_{17}$ /pristan og  $n\text{-C}_{18}$ /phytan er normerede i forhold til startbetingelserne, således at afvigelsen fra 1,00 afspejler den mikrobielle nedbrydning.

I tabel 18 er anført resultaterne af prøverne tilsat formalin. Prøverne havde et olieindhold på 5,0 g/l og blev analyseret ved forsøgets afslutning efter 19 uger. Resultaterne for forholdene  $n\text{-C}_{17}$ /pristan og  $n\text{-C}_{18}$ /phytan er ca. 1,00 og bekræfter således anvendelsen af disse størrelser som indikatorer for en mikrobiel nedbrydning. Resultaterne for total olie viser, at der er sket en fordampning af oliekomponenter i forsøgsperioden. Som forventet er fundet den største fordampning ved 20°.

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{pristan}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{phytan}$
		ekspe- riment	kontrol	korri- geret	ekspe- riment	kontrol	korri- geret			
0	8,0							0,46	0,96	0,98
1	8,1	570	130	440	< 0,3	0,4	0	0,40	0,99	0,98
2	8,2	4.940	80	4.900	0,3	0,9	0	0,39	0,97	1,00
3	8,2	3.900	1.010	2.900	4,3	0,7	3,6	0,42	0,98	1,00
5	8,2	3.160	120	3.000	0,9	0,9	0	0,39	0,99	1,03
8	8,2	7.500	1.200	6.300	0,9	0,3	0,6	0,35	0,93	0,95
12	8,2	8.500	4.900	3.600	9,3	4,0	5,3	0,28	0,88	0,89
19	8,2	23.100	60.000	0	9,3	9,3	0	0,26	0,72	0,78

x)  $\frac{n-C_{17}}{pristan}$  og  $\frac{n-C_{18}}{phytan}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 10. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 1

Forsøgsbetingelser: A<sub>1</sub> - vand uden sediment  
 B<sub>1</sub> - Ekofisk råolie  
 C<sub>1</sub> - 4°C  
 D<sub>1</sub> - 0,05% olie  
 E<sub>1</sub> - uden næringsalte

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{\text{pristan}}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{\text{phytan}}$
		ekspe- riment	kontrol	korri- geret	ekspe- riment	kontrol	korri- geret			
0	8,1							4,9	1,01	0,99
1	7,9	8.200	$4,1 \times 10^6$	0	9	< 3	9	4,9	0,98	1,02
2	8,1	$2,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	400.000	460	< 3	460	-	1,01	0,97
3	8,2	$1,1 \times 10^6$	61.000	$1,0 \times 10^6$	>2.400	4	>2.400	4,5	0,74	0,76
5	8,2	$1,2 \times 10^6$	56.000	$1,1 \times 10^6$	460	4	460	4,4	0,88	0,87
8	8,1	420.000	44.000	380.000	43	3	40	4,0	0,90	0,88
12	8,2	810.000	21.000	790.000	1.100	< 3	1.100	4,0	0,90	0,87
19	8,3	$2,0 \times 10^6$	73.000	$1,9 \times 10^6$	2.100	< 3	2.100	3,9	0,76	0,57

x)  $\frac{n-C_{17}}{\text{pristan}}$  og  $\frac{n-C_{18}}{\text{phytan}}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 11. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 2

Forsøgsbetingelser: A<sub>2</sub> - vand med sediment  
 B<sub>1</sub> - Ekofisk råolie  
 C<sub>1</sub> - 4°C  
 D<sub>2</sub> - 0,5% olie  
 E<sub>1</sub> - uden næringsalte



Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}}{\text{pristan}}$ <sup>x)</sup>	$\frac{n-C_{18}}{\text{phytan}}$ <sup>x)</sup>
		ekspe- riment	kontrol	korri- geret	ekspe- riment	kontrol	korri- geret			
0	7,5							5,3	0,99	0,95
1	7,6	590	110	480	0,7	< 0,3	0,7	-	1,01	1,00
2	7,4	520	58	460	< 0,3	< 0,3	< 0,3	5,1	0,77	0,80
3	7,5	13.500	160	13.300	0,9	< 0,3	0,9	5,3	0,97	0,98
5	7,5	90.000	2.900	87.000	15	< 0,3	15	4,6	0,84	0,83
8	7,4	380.000	16.800	360.000	0,7	< 0,3	0,7	3,4	0,85	0,80
12	7,1	780.000	27.000	750.000	110	0,9	109	4,4	0,72	0,74
19	6,9	$3,7 \times 10^6$	24.800	$3,6 \times 10^6$	15	< 0,3	15	4,0	0,63	0,62

x)  $\frac{n-C_{17}}{\text{pristan}}$  og  $\frac{n-C_{18}}{\text{phytan}}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 12. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 3

Forsøgsbetingelser: A<sub>1</sub> - vand uden sediment  
 B<sub>2</sub> - Iran Light råolie  
 C<sub>1</sub> - 4°C  
 D<sub>2</sub> - 0,5% olie  
 E<sub>2</sub> - med næringssalte

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{pristan}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{phytan}$
		ekspe- riment	kontrol	korri- geret	ekspe- riment	kontrol	korri- geret			
0	7,4							0,50	0,99	0,99
1	7,5	810.000	85.000	720.000	43	< 3	43	0,39	0,97	0,99
2	7,6	370.000	870.000	0	43	< 3	43	0,28	0,64	0,69
3	7,8	$2,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	460	< 3	460	0,22	0,61	0,66
5	7,8	$7,5 \times 10^6$	270.000	$7,2 \times 10^6$	> 2.400	< 3	>2.400	0,23	0,62	0,48
8	7,9	$8,2 \times 10^6$	230.000	$8,0 \times 10^6$	1.100	4	1.100	0,12	0,48	0,44
12	7,7	$2,5 \times 10^6$	38.000	$2,5 \times 10^6$	> 2.400	9	>2.400	0,13	0,14	0,13
19	7,4	$4,7 \times 10^6$	53.000	$4,6 \times 10^6$	1.100	4	1.100	0,15	< 0,1	< 0,1

x)  $\frac{n-C_{17}}{pristan}$  og  $\frac{n-C_{18}}{phytan}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 13. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 4

Forsøgsbetingelser: A<sub>2</sub> - vand med sediment  
 B<sub>2</sub> - Iran Light råolie  
 C<sub>1</sub> - 4°C  
 D<sub>1</sub> - 0,05% olie  
 E<sub>2</sub> - med næringsalte

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{pristan}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{phytan}$
		ekspe- riment	kontrol	korri- geret	ekspe- riment	kontrol	korri- geret			
0	7,6						5,2	0,99	0,99	
1	7,7	82.000	80.000	2.000	2,0	0,9	1,1	4,6	1,00	1,02
2	7,4	$1,6 \times 10^6$	154.000	$1,4 \times 10^6$	4,3	0,4	3,9	-	0,94	0,95
3	7,4	$6,6 \times 10^6$	260.000	$6,3 \times 10^6$	9,3	1,5	7,8	4,9	0,96	0,99
5	7,4	$22 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$20 \times 10^6$	110	0,4	110	4,5	0,92	0,92
8	7,3	$10 \times 10^6$	200.000	$10 \times 10^6$	21	< 0,3	21	3,0	0,91	0,87
12	6,6	$4,1 \times 10^6$	200.000	$3,9 \times 10^6$	>2.400	0,9	>2.400	3,0	0,14	0,13
19	6,2	$6,6 \times 10^6$	440.000	$6,2 \times 10^6$	>2.400	24	>2.400	3,6	0,22	0,15

x)  $\frac{n-C_{17}}{pristan}$  og  $\frac{n-C_{18}}{phytan}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 14. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 5

Forsøgsbetingelser: A<sub>1</sub> - vand uden sediment  
 B<sub>1</sub> - Ekofisk råolie  
 C<sub>2</sub> - 20°C  
 D<sub>2</sub> - 0,5% olie  
 E<sub>2</sub> - med næringssalte

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{pristan}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{phytan}$
		ekspe- riment	kontrol	korri- geret	ekspe- riment	kontrol	korri- geret			
0	7,4							0,43	0,95	0,97
1	7,5	$6,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	28	15	13	0,31	0,33	0,28
2	7,4	$14,2 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$10,4 \times 10^6$	7	4	3	0,27	< 0,1	0,21
3	7,6	$18,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$15,5 \times 10^6$	>2.400	3	>2.400	0,18	< 0,1	<0,1
5	7,5	$22 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$21 \times 10^6$	>2.400	3	>2.400	0,21	< 0,1	<0,1
8	7,5	$46 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$44 \times 10^6$	>2.400	460	>2.400	0,09	< 0,1	<0,1
12	7,4	$24 \times 10^6$	870.000	$23 \times 10^6$	>24.000	150	>24.000	0,06	< 0,1	<0,1
19	6,9	$23 \times 10^6$	390.000	$23 \times 10^6$	4.600	20	4.600	0,04	< 0,1	<0,1

x)  $\frac{n-C_{17}}{pristan}$  og  $\frac{n-C_{18}}{phytan}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 15. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 6

Forsøgsbetingelser: A<sub>2</sub> - vand med sediment  
 B<sub>1</sub> - Ekofisk råolie  
 C<sub>2</sub> - 20°C  
 D<sub>1</sub> - 0,05% olie  
 E<sub>2</sub> - med næringsalte

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{pristan}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{phytan}$
		eksperiment	kontrol	korri-geret	eksperiment	kontrol	korri-geret			
0	8,0							0,39	0,99	0,99
1	8,2	176.000	66.000	110.000	2,3	2,3	0	0,42	0,91	0,95
2	8,2	192.000	6.000	186.000	110	9,3	101	0,35	0,84	0,92
3	8,3	340.000	67.000	270.000	7,5	4,3	3,2	0,33	0,62	0,68
5	8,3	290.000	24.000	270.000	2,3	9,3	0	-	0,95	0,94
8	8,3	410.000	37.000	370.000	15	15	0	0,15	0,30	0,36
12	8,3	115.000	9.800	105.000	4,3	-	-	0,20	0,16	0,11
19	8,2	45.000	29.000	16.000	9,3	2,3	7,0	0,29	0,45	0,53

x)  $\frac{n-C_{17}}{pristan}$  og  $\frac{n-C_{18}}{phytan}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 16. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 7

Forsøgsbetingelser: A<sub>1</sub> - vand uden sediment  
 B<sub>2</sub> - Iran Light råolie  
 C<sub>2</sub> - 20°C  
 D<sub>1</sub> - 0,05% olie  
 E<sub>1</sub> - uden næringssalte

Tid, uger	pH	Totalkim pr. ml			Olienedbrydende kim pr. ml			Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}^{x})}{pristan}$	$\frac{n-C_{18}^{x})}{phytan}$
		eksperiment	kontrol	korri-geret	eksperiment	kontrol	korri-geret			
0	8,1							5,3	1,01	1,01
1	8,0	760.000	530.000	230.000	9	7	2	5,0	0,92	0,91
2	8,0	780.000	570.000	210.000	7	15	0	4,4	1,06	1,05
3	8,2	$4,7 \times 10^6$	48.000	$4,7 \times 10^6$	43	< 3	43	-	0,86	0,90
5	8,1	$3,4 \times 10^6$	33.000	$3,4 \times 10^6$	< 3	7	0	4,1	0,71	0,72
8	8,2	$2,0 \times 10^6$	70.000	$1,9 \times 10^6$	9	4	5	3,4	0,89	0,81
12	8,2	$2,5 \times 10^6$	43.000	$2,5 \times 10^6$	>2.400	21	>2.400	3,7	0,77	0,78
19	8,2	$6,0 \times 10^6$	117.000	$5,9 \times 10^6$	23	4	17	3,0	0,28	0,29

x)  $\frac{n-C_{17}}{pristan}$  og  $\frac{n-C_{18}}{phytan}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne)

Tabel 17. Resultater fra nedbrydelighedsforsøg, serie 8

Forsøgsbetingelser: A<sub>2</sub> - vand med sediment  
 B<sub>2</sub> - Iran Light råolie  
 C<sub>2</sub> - 20°C  
 D<sub>2</sub> - 0,5% olie  
 E<sub>1</sub> - uden næringssalte

Olie	Temperatur °C	pH	Total olie g/l	$\frac{n-C_{17}}{\text{pristan}}$ *)	$\frac{n-C_{18}}{\text{phytan}}$ *)
Ekofisk	4	8,1	4,5	0,97	0,99
Ekofisk	20	8,1	3,8	0,98	0,98
Iran Light	4	8,1	4,7	1,02	1,00
Iran Light	20	8,1	4,0	1,01	1,01

\*)  $\frac{n-C_{17}}{\text{pristan}}$  og  $\frac{n-C_{18}}{\text{phytan}}$  er normeret i forhold til standardolien (startbetingelserne).

Tabel 18. Resultater fra prøver tilsat 0,2% formalin.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 KVANTITATIVE UNDERSØGELSER OVER FOREKOMST AF TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM

I tabellerne 19 - 22 er resultaterne af totalkim og olienedbrydende bakterier opdelt i koncentrationsintervaller.

Tabel 19 gengiver resultaterne for totalkim i vand. Af tabellen fremgår, at kimtallet er højest i vand fra Færingehavn, mens niveauet er ens i vand fra Kigdlut Iluat og Fylla banke. På resultaterne fra Fylla banke er udført et statistisk test til undersøgelse af, om der er forskel på de fundne totalkimtal for juni og september. Testet viser, at der ikke er forskel på juni og september.

Lokalitet	Prøvetagningsdato	Antal prøver	Totalkim, antal			
			< 1 pr. ml	1-9 pr. ml	10-100 pr. ml	> 100 pr. ml
Fylla banke	1/6	15	6	5	4	0
Fylla banke	25/9	15	4	9	2	0
Færingehavn	18/9	7	0	1	4	2
Kigdlut Iluat	22/9	7	1	5	0	1

Tabel 19. Opdeling af resultater for totalkim i vand.



Tabel 20 gengiver resultaterne for totalkim i sedimenter. Ved sammenligning af resultaterne fra september ses, at kimtallet er højest i sediment fra Færingehavn og lavest i sediment fra Kigdlut Iluat. Den fundne forskel mellem Færingehavn og Kigdlut Iluat er mere markant end i de tidligere undersøgelser fra 1977 /2/. Et statistisk test på de fundne totalkimtal viser, at der i sedimenter fra Fylla banke er fundet højere kimtall i juni end i september.

Lokalitet	Prøvetag- ningsdato	Antal prøver	Totalkim, antal			
			< 100 pr. g	100-999 pr. g	1000-10000 pr. g	> 10000 pr. g
Fylla banke	1/6	15	5	4	4	2
Fylla banke	25/9	15	8	6	1	0
Færinge- havn	18/9	7	2	1	2	2
Kigdlut Iluat	22/9	7	6	1	0	0

Tabel 20. Opdeling af resultater for totalkim i sediment.

Tabel 21 angiver resultaterne for olienedbrydere i vand. Af tabellen fremgår, at antal olienedbrydende bakterier generelt er lavt og lavest i vand fra Fylla banke. Et statistisk test viser ingen sikker forskel på antallet af olienedbrydere i vandprøver fra Fylla banke udtaget i henholdsvis juni og september, men der er dog en tendens til, at junitallene er størst.

Lokalitet	Prøvetagningsdato	Antal prøver	Olienedbrydere, antal			
			< 0,1 pr. ml	0,1-0,9 pr. ml	1-9 pr. ml	10-100 pr. ml
Fylla banke	1/6	15	14	0	1	0
Fylla banke	25/9	15	15	0	0	0
Færingehavn	18/9	6	0	3	3	0
Kigdlut Iluat	22/9	7	0	5 *)	1	1

\*) I to prøver kan antal olienedbrydere være < 0,1 pr. ml.

Tabel 21. Opdeling af resultater for olienedbrydere i vand.

Tabel 22 angiver resultaterne for olienedbrydere i sediment. Af tallene fra september fremgår, at antal olienedbrydende bakterier er fundet højest i sediment fra Færingehavn. Et statistisk test viser, at der i sediment fra Fylla banke er fundet højere antal olienedbrydere i juni end i september.

Lokalitet	Prøvetagningsdato	Antal prøver	Olienedbrydere, antal			
			< 1 pr. g	1-9 pr. g	10-100 pr. g	> 100 pr. g
Fylla banke	1/6	15	3	4	6	2
Fylla banke	25/9	15	8	7	0	0
Færingehavn	18/9	7	0	5	0	2
Kigdlut Iluat	22/9	7	3	3	1	0

Tabel 22. Opdeling af resultater for olienedbrydere i sediment.

De her tilvejebragte resultater fra 1978 må ses som et supplement til de forholdsvis få resultater fra 1977 /2/. Resultaterne stemmer udmærket overens, idet der dog i 1978 er fundet en mere markant forskel på kimtallet i Færingehavn og Kigdlut Iluat.

## 5.2 KVALITATIVE UNDERSØGELSER AF ISOLEREDE OLIENEDBRYDENDE BAKTERIESTAMMER

I juni 1978 blev isoleret 60 olienedbrydende bakteriestammer fra Fylla banke repræsenterende sediment og vand (se tabel 7). Disse isolationer domineredes totalt af en laksepigmenteret coccoid, grampositiv stav, hvis biokemiske egenskaber fremgår af tabel 8. Forgæringsresultaterne viser, at samtlige isolerede grampositive stammer fra juni tilhører samme art. Der er tale om nonhæmolytiske, katalasepositive, cytochromoxydasenegative, tween-positive, glucosenegative, ikke saltkrævende, men saltresistente, nitratpositive, urinstofpositive bakterier med god vækst i temperaturintervallet 10 °C - 30 °C. Disse stammer voksede ikke ved 5 °C efter 1 uge. Enkelte stammer blev undersøgt med hensyn til telluritresistens og syrefasthed og alle undersøgte stammer var telluritresistente, men ikke syrefaste.

Omtalte olienedbrydende grampositive stavbakterier, som totalt har domineret ved udenskærsundersøgelser i juni 1978 kan ikke på basis af nuværende viden med sikkerhed henføres til kendte bakteriearter. Det synes rimeligt at antage, at der er tale om corynebakterier. Disse bakterier forekommer ofte i marine sedimenter og er netop karakteriseret ved ofte at optræde som ekstremt korte, telluritresistente, ubevægelige stave. Nitratreduktion og urinstofspaltning er kendt fra denne slægt. En enkelt corynebakterie (*Corynebacterium equi*) producerer laksepigmenterede kolonier og er i øvrigt potentiel patogen. Isolerede stammer fra Fylla banke adskiller sig imidlertid fra *Corynebacterium equi* ved at være H<sub>2</sub>S-negative, ikke-syrefaste og ved ikke at optræde med slimede, blanke kolonier på agarsubstrater.

Den isolerede olienedbrydende grampositive bakterie synes ikke aktiv ved 5 °C, men vil ved højere temperaturer i marine farvande kunne udnytte olien som kulstofkilde, hvilket også fremgår af nedbrydelighedsforsøg, hvor netop denne bakterie var aktiv.

I tabel 9 er gengivet resultater af biokemiske undersøgelser af gramnegative olienedbrydende bakterier isoleret fra Fylla banke i juni 1978. Forgæringskemaet viser, at de gramnegative bakterier modsat de grampositive er repræsenteret af flere forskellige bakteriearter. Den større diversitet må tillægges en positiv betydning for det naturlige mikrobiologiske beredskab til nedbrydning af olie i området. Det må ligeledes påpeges, at flere af de isolerede olienedbrydende gramnegative bakterier har evne til vækst ved 5 °C og således må antages at være aktive som olienedbrydere under arktiske forhold. Flere af disse bakteriearter er såvel saltkrævende som saltresistente og vil således være virksomme i marine områder. Det bemærkes, at flertallet af disse bakterier netop er isoleret fra nedbrydelighedsforsøg (jævnfør tabel 7). Flertallet af isolerede, olienedbrydende gramnegative bakterier er ikke-bevægelige, glucosenegative, oxydasepositive stammer, som formentlig kan henføres til moraxellagruppen, som ofte er påvist i marine områder. Cytochromoxydasenegative, glucosenegative ikke-bevægelige bakterier kan eventuelt henføres til Acinetobaktergruppen som ofte er isoleret fra havvand.

Der er isoleret overraskende få bevægelige og oxydative bakterier ved udenskærsundersøgelserne, hvilket viser, at Pseudomonas ikke synes rigt repræsenteret i materialet. Flere isolerede, olienedbrydende stammer har ikke kunnet henføres til bestemte arter eller slægter.

Tabel 9 viser desuden resultater af biokemiske undersøgelser af olienedbrydende gramnegative bakterier isoleret i september 1978 fra Færingehavn, Kigdlut Iluat og Fylla banke. Ubevægelige, glucosenegative, cytochromoxydase-negative bakterier dominerer i materialet, hvilket antyder, at Acinetobakter-lignende bakterier dominerer. Forgæringsresultaterne viser, at der er tale om forskellige gramnegative, olienedbrydende bakterier, hvilket igen antyder en ønsket diversitet og et bredspektret mikrobiologisk beredskab til eventuel olienedbrydning i farvandet, jævnfør /2/. Bevægelige, glucosenegative bakterier kan være Pseudomonasarter. Flertallet af isolerede bakterier vokser

ikke ved 5°C efter 1 uge og vokser ikke uden salttilsætning. Størst vækstintensitet ses i temperaturintervallet 10°C - 15 C.

Der er ikke i det samlede materiale omfattende isolationer fra juni 1978 og september 1978 påvist bakterier som samtidig er hæmolytiske, argininpositive og fermentative, hvilket viser, at fiskepatogene *Vibrio* ikke er påvist i det samlede materiale.

Som omtalt er prøverne fra juni helt domineret af en grampositiv laksepigmenteret stav. For prøverne fra september kan der ikke på basis af nærværende undersøgelser, jf. tabel 9, konstateres forskelle m.h.t. hvilke bakteriegrupper, der er karakteristiske for de respektive lokaliteter.

### 5,3 NEDBRYDELIGHEDSFORSØG

Til en vurdering af sammenhængen mellem de mikrobiologiske og de kemiske analyseresultater er resultaterne sammenstillet i tabel 23. I de to serier med den største nedbrydning (serie 4 og 6) er der en rimelig sammenhæng mellem de mikrobiologiske og de kemiske ændringer. Dette er også tilfældet i de to serier med den mindste nedbrydning (serie 1 og 3). I de øvrige serier er sammenhængen mindre udtalt.

Det skal understreges, at forsøgene er gennemført med olie som eneste kulstofkilde, hvorfor en vækst i totalalkimtal vil afspejle en aktivitet af olienedbrydende mikroorganismer.

I bilag 3 er angivet den beregningsmetodik, der er benyttet ved beregningen af, hvilken indflydelse de undersøgte faktorer har på den mikrobielle nedbrydning. Beregningen gennemførtes på resultaterne for korrigerede totalalkim og forholdene n-C<sub>17</sub>/pristan og n-C<sub>18</sub>/phytan. Derimod viste resultaterne for korrigerede olienedbrydere og totalolie sig at være behæftet med en så stor analytisk usikkerhed, at de var uanvendelige til vurdering af faktorernes indflydelse.

Resultaterne af disse beregninger er anført i tabel B.1 - B.3 i bilag 3. De i tabellerne anførte hovedvirkninger kan opfattes som et mål for den ændring, der vil fremkomme alene som følge af at ændre en

enkelt faktor fra den ene "værdi" til den anden "værdi". Eksempelvis kan den sidst anførte virkning i tabel B.1 (3,7 mill. kim pr. ml for faktor E efter 19 uger) tages som et mål for, at en tilsætning af næringssalte vil øge de korrigerede totalkim med 3,7 mill. kim pr. ml i forhold til ikke at tilsætte næringssalte.

Forsøgs- serie	Antal uger før			
	korrigeret totalkim	korrigerede olienedbrydere	C <sub>17</sub> /pristan og C <sub>18</sub> /phytan	Olierest
	> 0,5 mill. pr. ml.	> 1000 pr. ml	begge <0,7	< 50%
1	-	-	-	-
2	3	3	-	-
3	12	-	19	-
4	1 - 3	5	2	3
5	2	12	12	-
6	1	3	1	3
7	-	-	3	-
8	3	12	19	8 - 19

- betyder, at den angivne ændring ikke er opnået i forsøgsperioden (19 uger).

Tabel 23. Mikrobiologiske og kemiske ændringer under nedbrydelighedsforsøg som funktion af tiden.

Tallene i tabellen angiver det antal uger, der er forløbet, inden den angivne ændring har fundet sted.

De mikrobiologiske og kemiske undersøgelser viser en pæn overensstemmelse, idet begge metoder viser, at de 4 faktorer, hvis indflydelse estimeres, i hele forsøgsperioden har signifikant virkning. Ved de mikrobiologiske undersøgelser viser en positiv effekt på nedbrydningen af olie sig som en vækst i totalkim, altså en positiv hovedvirkning, jf. tabel B.1. Ved de kemiske undersøgelser viser en positiv effekt sig derimod som et fald i n-C<sub>17</sub>/pristan henholdsvis n-C<sub>18</sub>/phytan, altså en negativ hovedvirkning, jf. tabel B.2 og B.3. Det er fundet, at følgende ændringer af faktorerne fremmer den mikrobielle nedbrydning:

Faktor A - tilstedeværelsen af sediment

Faktor C - en temperaturstigning fra 4°C til 20°C

Faktor D - et fald i oliekoncentrationen fra 0,5% til 0,05%

Faktor E - tilsætning af næringsalte

Indflydelsen af faktor B (olietypen) har som tidligere nævnt ikke kunnet estimeres.

Tilstedeværelsen af sediment har en positiv effekt på den mikrobielle nedbrydning. Effekten ses allerede efter en uge og holder sig gennem hele forsøgsperioden på 19 uger. Effekten hænger uden tvivl sammen med, at der med sediment tilføres såvel mikroorganismer som næringsalte. Undersøgelsen af den mikrobiologiske situation på Fylla banke har vist, jf. afsnit 4.1 og 4.2, at sediment har en langt rigere bakterieflora end vandet, også hvad angår olienedbrydende mikroorganismer. Hvorvidt sedimentets indhold af mikroorganismer eller indholdet af næringsalte er den vigtigste årsag til den positive effekt kan ikke afsløres af disse forsøg.

En temperaturstigning fra 4°C til 20°C har som ventet en kraftig positiv effekt på nedbrydningen. Denne effekt ses ligeledes allerede efter en uge og holder sig gennem hele forsøgsperioden. Skønt nedbrydningen således foregår langsommere ved 4°C, viser forsøgene dog samtidigt, at olien kan nedbrydes ved 4°C, processen er blot langsommere ved denne lave temperatur. Dette ses tydeligt ved sammenligning af serie 4 og 6 eller serie 2 og 8, se tabel 11, 13, 15 og 17. Dette forhold er af stor betydning for effekten af en olieforurening i arktiske farvande som de grønlandske, idet en mikrobiel nedbrydning altså kan foregå, selv ved de lave vandtemperaturer, der findes i disse farvande.

Et fald i oliekoncentrationen fra 0,5% til 0,05% har en positiv effekt på nedbrydningen. Resultaterne for totalkim tyder på, at fra 3. uge til forsøgets afslutning er oliekoncentrationen den faktor, der har mindst betydning for nedbrydningen, jf. tabel B.1 i bilag 3. Derimod synes oliekoncentrationen i de første 2 uger at have lige så stor betydning som de øvrige faktorer. Dette forhold kan forklares ved, at



en højere oliekoncentration ved forsøgets start har en inhiberende virkning over for mikroorganismene, og at disse efterhånden akklimatiseres. Det skal understreges, at oliekoncentrationen under naturlige forhold sjældent vil være så høj som i denne undersøgelse.

Tilsætning af næringssalte har som ventet en positiv effekt på nedbrydningen. Resultaterne for totalkim indikerer, at fra 5. uge til forsøgets afslutning er næringssaltene den faktor, der har størst betydning for nedbrydningen, jf. tabel B.1 i bilag 3. Næringssaltenes betydning synes derimod ikke i de første 3 uger at være større end de andre faktorer. Dette stemmer overens med, at det først er efter en kraftig vækst af mikroorganismer, at næringssaltene bliver en begrænsende faktor for en yderligere vækst.

Ovenfor er det for oliekoncentrationen og næringssaltene fremhævet, at totalkimtallene viser tendenser, som ikke ses af tallene fra  $n\text{-C}_{17}$ /pristan og  $n\text{-C}_{18}$ /phytan forholdene. Det skal i denne forbindelse erindres, at totalkimtallene gennem hele forsøget tages i den samme forsøgskolbe, mens de kemiske analyser udføres på en ny kolbe fra gang til gang. Resultaterne fra de kemiske analyser vil derfor foruden den analytiske usikkerhed være behæftet med en "biologisk usikkerhed".

Det er interessant, at det korrigerede kimtal i nærværende forsøg har været et rimeligt instrument til at angive udviklingsforløbet med hensyn til oliens nedbrydning. Bestemmelsen af korrigeret tal for olienedbrydere er derimod i nærværende forsøg behæftet med en stor usikkerhed. Dette kan blandt andet skyldes, at olienedbrydende bakterier er adhæreret til oliepartikler, og at der i nogen grad kan blive tale om "partikeltælling", hvor hver oliepartikel kan repræsentere mange olienedbrydere, og hvor der følgelig generelt vil være en tendens til for lave tal.

Det må bemærkes, at tællingsmetoder til totaltælling af kim giver større mulighed for at skille olieadhærerede bakterier fra hinanden og tælle enkelte organismer, end det er tilfældet ved tælling af olienedbrydere. Tælling af olienedbrydere forudsætter derfor en mere effektiv homogenisering af prøven end normalt anvendt ved totalkimtælling.

Der registreres i disse forsøg en opformering af bakterier også i kontrolforsøg uden olietilsætning. En sådan opformering af naturlige vandbakterier i et næringsfattigt miljø er kendt fra andre typer af vandundersøgelser, hvor små delmængder af vand tages ud af en større enhed. Der er tale om opformering af bakterier i mindre tubes, kolber og flasker, hvor rumfang er relativt mindre i forhold til emballagens indre overfladeareal, hvor næringsstoffer koncentrerer og opformering foregår. Opgivelser af bakterietal i nedbrydelighedsforsøg må følgelig ske som korrigerede kimal.

## 6. KONKLUSION

Nærværende undersøgelser har omfattet kvantitative og kvalitative mikrobiologiske undersøgelser af vand og sedimenter fra indenskærs og udenskærs områder ved Vestgrønland. Desuden er udført nedbrydelighedsforsøg, hvor olies nedbrydning er fulgt ved mikrobiologiske og kemiske analyser. På basis af undersøgelserne kan følgende konkluderes:

1. såvel udenskærs som indenskærs forekommer der flere arter af olienedbrydende bakterier, som ved lave temperaturer og under marine forhold kan nedbryde olie,
2. såvel totalkimtal som antal olienedbrydende bakterier er højest i Færingehavn, hvor der er olieforurening fra tankanlægget Polaroil,
3. antallet af totalkim og olienedbrydende bakterier i vandfasen er generelt lavt i alle 3 undersøgte områder: Færingehavn, Kigdlut Iluat og Fylla banke,
4. i sedimenter fra Fylla banke er der fundet højere antal totalkim og olienedbrydende kim i juni end i september, hvorimod der ikke kunne konstateres forskel på kimindhold i vandprøver,
5. blandt de isolerede olienedbrydende bakterier fundet inden- og udenskærs er der ikke fundet kendte human- eller fiskepatogene bakterier,
6. tilstedeværelsen af sediment i laboratorieforsøgene virker stærkt fremmede på nedbrydningen af olie,
7. en temperaturstigning fra 4°C til 20°C virker som ventet fremmede på nedbrydningen, men olie nedbrydes ved 4°C, processen er blot langsommere ved den lave temperatur.

8. en forøgelse af oliekoncentrationen fra 0,05% til 0,5% virkede i forsøgets start hæmmende på nedbrydningen (toxisk effekt ?), hvorimod påvirkningen var ringe senere i forsøget,
9. tilsætning af uorganiske næringssalte virker stærkt fremmende på nedbrydningen, og denne effekt var størst fra forsøgets 5. uge til afslutningen efter 19 uger,
10. som et mål for olienedbrydningen har bestemmelsen af to-talkim vist sig mere velegnet end bestemmelsen af olienedbrydende kim,
11. organiske buffere som for eksempel TRIS-buffer er ikke anvendelige ved nedbrydelighedsforsøg med langsomt nedbrydelige stoffer, idet organiske buffere synes at kunne indgå som kulstof- og energikilde i et forsøg, hvis forudsætning netop er, at olien selv udgør den eneste kulstof- og energikilde.

## 7. LITTERATURLISTE

- /1/ Jensen, V.B., N. Hansen og P. Johansen,  
"Hydrocarboner i marine organismer og sedimenter  
ved Vestgrønland".  
Rapport til Ministeriet for Grønland, december 1977.
- /2/ Kristensen, K.K. og H. Petersen,  
"Olienedbrydende mikroorganismer i Færingehavn,  
Malenebugten og Kigdlut Iluat".  
Rapport til Ministeriet for Grønland, januar 1978.
- /3/ Mills, A.G., C. Brezil og R.R. Colwell,  
Enumeration of petroleum degrading marine and estuarine  
microorganisms by the most probable number method.  
In press.
- /4/ Brøndum, L., J.D. Monrad og Aa. Vølund,  
"Statistisk forsøgsplanlægning II".  
Teknisk Forlag, 1972.
- /5/ A/S Dansk Shell,  
Personlig meddelelse.
- /6/ USNS Potomac Oil Spill. Melville Bay, Greenland,  
August 5, 1977.  
En fælles rapport fra National Oceanic and Atmospheric  
Administration (NOAA), U.S.A., og Grønlands Fiskeri-  
undersøgelser, august 1979.
- /7/ Lehmann, K.,  
Personlig meddelelse.

BILAG 1

SUBSTRAT TIL TOTALKIM

Marinagar

Bacto-pepton	5	g
Bacto-gærekstrakt	1	g
FeCl <sub>3</sub>	0,1	g
NaCl	19,45	g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,24	g
MgCl <sub>2</sub>	8,8	g
CaCl <sub>2</sub>	1,8	g
KCl	0,55	g
NaHCO <sub>3</sub>	0,16	g
KBr	0,08	g
SrCl <sub>2</sub>	0,034	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,022	g
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,004	g
NaF	0,0024	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,0016	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,008	g
Bacto-agar	15	g

Ved brug tilsættes 55,1 g substrat til 1000 ml koldt destilleret vand, og der opvarmes til kogning for at opløse substratet. Sterilisation ved 121°C i 15 minutter og pH indstilles på 7,6.

BILAG 2

SUBSTRAT TIL OLIE NEDBRYDENDE MIKROORGANISMER

Colwell-substrat til MPN-tælling:

NaCl	24	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	g
KCl	0,7	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0	g

Stofferne opløses i 1 l destilleret vand.

pH indstilles på 7,1 efter sterilisation ved 115°C i 10 minutter.

### BILAG 3

#### BESKRIVELSE AF BEREGNINGSMETODIK I NEDBRYDELIGHEDSFORSØG

Der anvendes en forsøgsplan for et partielt  $2^k$  - faktorforsøg.  
For en nøjere gennemgang kan for eksempel henvises til /4/.

Faktorernes værdi var følgende:

- A: A<sub>1</sub> - vand uden sediment  
A<sub>2</sub> - vand med sediment
- B: B<sub>1</sub> - Ekofisk råolie  
B<sub>2</sub> - Iran Light råolie
- C: C<sub>1</sub> - 4°C  
C<sub>2</sub> - 20°C
- D: D<sub>1</sub> - 0,05% olie  
D<sub>2</sub> - 0,5% olie
- E: E<sub>1</sub> - uden næringssalte  
E<sub>2</sub> - med næringssalte

Strukturen er en  $2^{5-2}$  faktorstruktur med aliasrelationerne

$$D = ABC, \quad E = -BC.$$



Strukturens behandlinger er:

	A	B	C	ABC	-BC	Behandlinger
(1)	-	-	-	-	-	(1)
a	+	-	-	+	-	ad
b	-	+	-	+	+	bde
ab	+	+	-	-	+	abe
c	-	-	+	+	+	cde
ac	+	-	+	-	+	ace
bc	-	+	+	-	-	bc
abc	+	+	+	+	-	abcd

Forsøgsplanen muliggør en estimation af 5 hovedvirkninger og 2 2-faktor vekselvirkninger. Disse er sammenblandet som følger:

$$A = BCD = -ABCE$$

$$B = -CE = ACD$$

$$C = -BE = ABD$$

$$D = ABC = -BCDE$$

$$E = -BC = ABCDE$$

$$CD = AB = -ACE$$

$$AC = BD = -ABE$$

Alle vekselvirkninger over 2 faktorer lades ude af betragtning. Ud fra kendskab til faktorerne kan endvidere ses bort fra vekselvirkningerne -BE, -BC og AB, idet de kan regnes ubetydelige i forhold til de virkninger, de er sammenblandet med. Følgende virkninger kan estimeres rent:

$$A, C, D, E, CD,$$

mens følgende er sammenblandet:

$$B = -CE, \quad AC = BD.$$

Beregningerne udføres efter Yates-metoden. Først testes ved F-test, hvorvidt virkningerne er signifikante. Ved test for totalkim transformeres resultaterne til kvadratroden, idet tallene er Poisson fordelt. De 4 hovedvirkninger A, C, D og E beregnes dernæst, ligeledes ved Yates-metoden.

Resultaterne af beregningerne er anført i tabellerne B1 - B3. I tabellerne er givet de 4 estimerede hovedvirkninger beregnet ud fra henholdsvis totalkim,  $n-C_{17}$ /pristan forhold og  $n-C_{18}$ /phytan forholdet.

Uge	Hovedvirkninger, mill. kim pr. ml				Gennemsnitligt totalkim for alle 8 forsøgsserier, mill. kim pr. ml
	A	C	D	E	
1	0,6	0,5	-0,6	0,6	0,7
2	1,2	1,5	-1,2	1,5	1,6
3	2,1	2,9	0	2,3	3,8
5	1,5	4,6	0	5,5	6,7
8	5,4	5,9	-5,0	7,5	8,4
12	3,0	3,2	-2,2	3,4	4,2
19	3,2	3,1	-1,3	3,7	5,7

Tabel B.1. Hovedvirkninger beregnet ud fra de korrigerede totalkim.

Uge	Hovedvirkning				Gennemsnitligt n-C <sub>17</sub> /pristan forhold for alle 8 forsøgsserier
	A	C	D	E	
1	-0,09	-0,10	0,09	-0,06	0,89
2	-0,10	-0,19	0,17	-0,19	0,65
3	-0,17	-0,23	0,17	-0,08	0,59
5	-0,19	-0,09	0,10	-0,14	0,74
8	-0,09	-0,13	0,23	-0,10	0,66
12	0	-0,20	0,17	-0,21	0,46
19	-0,12	-0,15	0,09	-0,17	0,38

Tabel B.2. Hovedvirkninger beregnet ud fra det normerede n-C<sub>17</sub>/pristan forhold.

Uge	Hovedvirkning				Gennemsnitligt n-C <sub>18</sub> /phytan forhold for alle 8 forsøgsserier
	A	C	D	E	
1	-0,09	-0,10	0,09	-0,07	0,89
2	-0,09	-0,04	0,12	-0,16	0,82
3	-0,17	-0,10	0,16	-0,09	0,75
5	-0,21	-0,08	0,11	-0,17	0,72
8	-0,11	-0,13	0,20	-0,11	0,64
12	0	-0,20	0,17	-0,21	0,46
19	-0,15	-0,13	0,04	-0,18	0,37

Tabel B.3. Hovedvirkninger beregnet ud fra normerede n-C<sub>18</sub>/phytan forhold.