

# Miljøovervåkning i kulturlag ved kaifronten av Bryggen i Bergen med spesiell fokus på aktivitet av sulfatreduserende mikroorganismer

## Bakgrunn

I forbindelse med installering av miljøbrønner i kaifronten av Bryggen i Bergen ble det tatt jordprøver til videre undersøkelser på laboratoriet. I denne forbindelse var det aktuelt å vurdere effekten av sjøvannsinnrensning på nedbrytningen av kulturlagene. Bakgrunnen for dette er at kulturlagene ikke inneholder oksygen, men under slike forhold kan sulfat brukes av mikroorganismene til å bryte ned organisk materiale. Under forhold hvor det verken finnes oksygen eller sulfat, men bare produseres metan, vil nedbrytning av trevirke kunne ta mer enn tusen år. Nedbrytning er også vanligvis langsommere med sulfat enn med oksygen, men det er ikke kjent i hvilken grad høy sulfatkonsentrasjon vil kunne stimulere nedbrytningen, og det ble derfor foreslått å undersøke dette nærmere. Denne kunnskapen kan sammen med den hydrologiske modelleringen komplettere risikovurderingen av de faktorene som fører til nedbrytning av kulturlagene ved Bryggen i Bergen, samt bidra i vurderingen av effekten av økt saltvannsinnrensning som er forventet i forbindelse med klimaendringen.

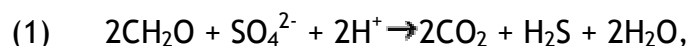
## Litt om sulfatreduserende bakterier

Mikrofloraen i marine miljøer som har tilgang på mye organisk materiale, er dominert av heterotrofe mikroorganismer som lever av å bryte ned dette organiske materiale. Tilførselen vil kunne være spesielt stor i forurensede fjorder med sterk algevekst, eller steder med tilførsel av organisk materiale fra utslipp av kloakk eller utslipp fra industri, for eksempel fra treforedling og trevareindustri. Dersom sediment eller kulturlag inneholder oksygen, så vil det aller øverste laget av sedimentene eller jordlagene være dominert av aerobe mikroorganismer. Disse organismene benytter oksygen som oksidasjonsmiddel. I sedimenter vil det aerobe laget bare være noen millimeter eller centimeter dypt, avhengig av tilgangen på organisk materiale, permeabilitet og temperatur. I jord vil mektigheten av laget være avhengig av miljøforholdene. Andre oksidasjonsmidler som vi kan finne i disse øverste lagene, kan være nitrat og treverdige jern (Ronald M. Atlas og Richard Bartha, 1981). Under disse øverste lagene finner vi anaerobe sulfatreduserende bakterier som benytter sulfat som oksidasjonsmiddel.

Sulfatreduserende bakterier er spesielt viktige i sjøvannsedimenter og kulturlag som er påvirket av sjøvannsinnrensning siden sjøvann inneholder store mengder sulfat - ca. 2,8 gram per liter sjøvann. Til sammenligning inneholder sjøvann som er mettet med luft, bare 8 til 10 mg O<sub>2</sub> per liter. Derfor vil sulfatreduserende bakterier stå for en stor del av mineraliseringen av organisk materiale i marint miljø. Sulfatreduserende bakterier er ansvarlige for opp mot halvparten av den totale mineraliseringen av sedimentert organisk materiale i grunne sedimenter (Kasten, S. og B.B. Jørgensen, 2000), og vi vil anta at det samme gjelder for kulturlag i marint miljø så lenge tilgangen på sulfat og organisk substrat er tilstrekkelig.

Sulfatreduserende bakterier er strengt anaerobe og prosessen vil hemmes, eller stoppe fullstendig opp i nærvær av oksygen eller nitrat. De utgjør en svært heterogen gruppe, både morfologisk og fysiologisk, men har til felles at de kan benytte sulfat i stedet for oksygen som oksidasjonsmiddel og de danner hydrogenulfid (H<sub>2</sub>S) i stedet for vann (H<sub>2</sub>O) som redusert sluttprodukt.

Sulfatreduserende bakterier lever stort sett på gjæringsproduktene fra anaerob gjæring som for eksempel hydrogen (H<sub>2</sub>), maursyre, eddiksyre, propionat, melkesyre, høyere rette og forgrenede fettsyrer, enkle alkoholer og andre mindre organiske forbindelser, men de kan ikke leve på sukker og aminosyrer, parafiner eller naturlige polymerer (F. Widdel, 1986). Forholdet mellom forbruket av sulfat ved oksidasjon av organisk materiale kan forenklet beskrives med følgende uttrykk:



Ved å måle hvor fort sulfatreduksjonen foregår, så får vi også et mål på hvor raskt nedbrytningen av det organiske materialet foregår. De mikroorganismene som gjennom hydrolyse og gjæringsprosesser forsyner sulfatreduserende bakterier med gjæringsprodukter, kaller vi i det etterfølgende for primærnedbrytere.

## Metodikk

Aktiviteten til sulfatreduserende bakterier kan bestemmes på flere måter, og valg av metode vil være avhengig av problemstilling og hvor høy aktiviteten er forventet å være. I denne sammenheng var det aktuelt å vurdere tre ulike metoder:

1. Hvis man skal få et mål på aktiviteten slik den er i uforstyrrede sedimenter med lite sulfat, vil bruk av radiomerket sulfat være et naturlig valg. Radiomerket sulfat leveres bærefri slik at den mengden som tilføres blir ubetydelig i forhold til konsentrasjonen i prøven (selv i ferskvann). Inkubasjonstiden vil være kort, fra noen minutter til timer eller noen få dager, og avhengig av bakterienes aktivitet slik at forholdene endres minimalt.
2. Radiomerket sulfat kan også være å foretrekke dersom sulfatkonsentrasjonen er høy og dersom aktiviteten er svært lav, fordi man kan måle akkumulert radiomerket sulfid etter relativt kort tid (timer til dager). Hvis aktiviteten er tilstrekkelig høy eller inkubasjonstiden er lang (dager til uker), kan man også måle nedgangen i radiomerket sulfat.
3. Den enkleste framgangsmåten å måle nedbrytningshastigheten er å måle nedgang i sulfatmengden direkte. Slike målinger kan gjøres med kjemiske metoder eller med ved hjelp av såkalt turbidimeter. Denne metoden forutsetter imidlertid relativt høy nedbrytningsaktivitet. Hvis nedbrytningsaktiviteten er lav, blir nøyaktige målingene meget tidkrevende.

I utgangspunktet var planen å måle aktiviteten i prøver med og uten tilsetning av sulfat, ved hjelp av radioaktivt merket sulfat ( $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ ). Siden prøvematerialet inneholder svært mye flis og trebiter så var det ikke nok materiale til å gjennomføre begge deler. Det hadde også vært en fordel å kunne gjennomføre et preliminært forsøk for å få et mål på aktiviteten slik at prøvetakingsintervaller kunne bestemmes. Planene måtte derfor omarbeides noe, slik at vi kunne få mest mulig informasjon ut fra det materialet vi hadde til rådighet.

Det ble da tatt utgangspunkt i analyser av klorid og sulfat som allerede var gjennomført, for å se om disse resultatene kunne gi noe informasjon om aktiviteten i prøvene. Klorid utgjør ca 55 % av saltinnholdet i sjøvann, og selv om saltinnholdet varierer vil forholdet mellom sulfat og klorid være nær konstant ( $\text{mg SO}_4/\text{mg Cl} \sim 0,14$ ). Saliniteten i havet utenfor Bergen er 32 ‰, men vi har antatt at den ligger nærmere 20 ‰ i indre havn.

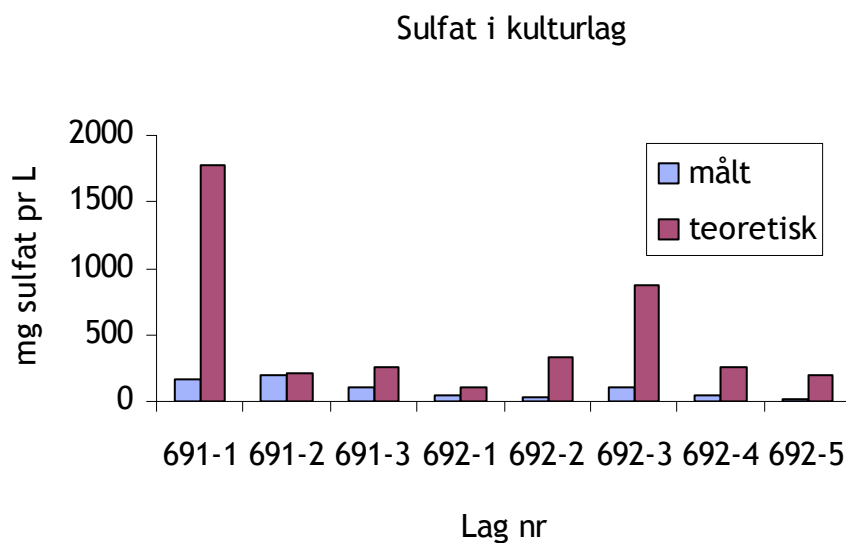
På denne bakgrunn ble det bestemt å gjennomføre ett korttidsforsøk over 24 timer med radiomerket sulfat der det også ble tilsatt fortynnet sjøvann i henhold til kloridkonsentrasjonen i prøvene. Forsøket med radioaktivt merket sulfat ble gjennomført etter metodene som er beskrevet av Westermann & Ahring (1988). Til hver 50 ml serumflaske (Bellco) ble det veid inn 5 g sediment som ble tilsatt 5 ml fortynnet sjøvann. Prøvene ble forhåndsinnkubert i 24 timer før tilsetning av tracer. Hver prøve ble innkubert i 0, 1, 2, 3, 12 og 24 timer etter tilsetning av 10 KBq  $^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$ . Aktiviteten bestemmes ved å måle på mengden merket sulfid som er produsert. Til resten av prøvematerialet ble det tilsatt rent sjøvann og disse prøvene ble innkubert i 32 dager før sulfat ble målt. I begge forsøkene ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av Zn-acetat. Sulfat ble bestemt etter turbidimetrisk metode (Tabatabai, 1974). Deretter ble ca 1 gram av disse prøvene brukt som podemateriale til nye kulturer for å undersøke effekten av å tilsette eddiksyre og cellulose. Eddiksyre kan utnyttes direkte av sulfatreduserende bakterier, mens cellulose må hydrolyseres og fermenteres før videre nedbrytning via sulfatreduksjon. Økt sulfatreduksjon etter tilsetning av eddiksyre vil indikere at aktiviteten til sulfatreduserende bakterier er karbonbegrenset, mens økt

aktivitet etter tilsetning av cellulose i tillegg vil indikere noe om forekomst og aktivitet til primærnedbryterne. Alle kulturer ble innkubert ved 10<sup>0</sup> C.

## Resultater og diskusjon

### Kjemiske analyser av sedimenter

Kloridkonsentrasjonen i prøvene tyder på at sjøvannsinnmengingen er begrenset i de fleste sjikt (fig 1). I prøven 691/1 fra brønn 24 er imidlertid inntrengingen fullstendig hvis vi antar at saliniteten er ca 23 ‰. Bortsett fra i 691/2, 691/3 og 692/1 var sulfatkonsentrasjonen mye lavere enn en skulle forvente ut fra kloridkonsentrasjonen. I jordlag hvor sulfatkonsentrasjonene er lavere enn forventet kan det ha foregått en betydelig sulfatreduksjon, enten før prøven ble tatt eller underveis før analysene ble gjennomført. Hvis transporten først og fremst er styrt av en konsentrasjonsgradient, vil mest sannsynlig mesteparten av sulfatreduksjonen ha foregått i over- eller foranliggende kulturlag før sulfat har trengt inn til der prøvene er tatt. I havnesedimenter hvor det er rikelig tilgang på organisk materiale, vil sulfatkonsentrasjonen ofte være mindre enn 100 mg L<sup>-1</sup> allerede 25 cm under sedimentoverflaten, mens saltholdigheten er relativt uforandret på mange meters dyp. I 691/2 var det ingen forskjell på teoretisk og målt sulfatkonsentrasjon. I utgangspunktet vil vi forvente at aktiviteten vil være lav i prøver der forholdet mellom målt og teoretisk sulfat er nær 1.



Figur 1. Teoretisk sulfatkonsentrasjon viser graden av sjøvannsinnmenging. Sulfatkonsentrasjon ved salinitet på 23 ‰ er 1782 mg L<sup>-1</sup>.

Bortsett fra den ene prøven 691/2 ga ikke disse resultatene noe entydig svar på hvilke sedimenter som var mer eller mindre aktive. Vi valgte derfor å gjennomføre et korttidsforsøk med merket sulfat og et langtidsforsøk med ekstra tilsetning av sulfat på alle sedimentene. Det ble vurdert å spare en av prøvene fra hvert sediment og innkubere denne i en uke eller 14 dager med merket sulfat, men siden vi ikke hadde nok materiale til parallelle prøver ble det bestemt å beholde alle prøvene til korttidsforsøkene slik at vi kunne få et best mulig bilde av reduksjonsforløpet. Det som var igjen i prøveglassene, inklusiv flis, stein og annet rask ble tilsatt 5 ml sjøvann og innkubert i 32 dager.

### Korttidsforsøk med <sup>35</sup>S-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Det kunne ikke påvises radioaktivt merket sulfid i prøvene. Vi kan likevel beregne hvor høy aktiviteten maksimalt kunne ha vært. Bakgrunnsaktiviteten i sulfidfellene var 20 cpm mL<sup>-1</sup> og vi regner 40 cpm (0,67 Bq) som en nedre grense for å kunne påvise aktivitet i sedimentet. Denne

differansen betyr at ca 0,3 % av det som ble tilsatt i prøven er syreflyktig sulfid. Hvis vi videre går ut fra prøven med høyest teoretisk sulfatkonsentrasjon og justerer for 6 % diskriminering av  $^{35}\text{S}$  i forhold til  $^{32}\text{S}$  og at syreflyktig sulfid utgjør 70 % av totalt produsert sulfid blir maksimal reduksjonsaktivitet  $8,1 \text{ mg sulfat L}^{-1} \text{ dag}^{-1}$ . Tilsvarende beregninger er gjort for alle prøvene og fremstilt i tabell 1 nedenfor. Alle verdiene ligger innenfor det som ofte måles i organiske sedimenter i marint miljø ( $0,2 - 20 \text{ mg sulfat L}^{-1} \text{ dag}^{-1}$ ). At vi ikke kunne påvise radioaktiv sulfid, skyldes antagelig at aktiviteten var lavere enn dette. Hvis det hadde vært mulig å gjenta forsøket, kunne vi økt følsomheten ved å tilsette mer merket sulfat. I tillegg kunne vi ha økt inkubasjonstiden og redusert volumet av sulfidfellene. Forsøket kunne imidlertid ikke gjentas siden vi hadde for lite materiale (sediment).

Tabell 1. Teoretisk maksimal sulfatreduksjon i kulturlag

Lag nr	$\text{mg SO}_4 \text{ L}^{-1} \text{ dag}^{-1}$
691-1	8,1
691-2	0,9
691-3	1,2
692-1	0,5
692-2	1,5
692-3	4,0
692-4	1,2
692-5	0,9

En annen forklaring kan være at metoden vi har brukt bare ekstraherer syreflyktig sulfid, det vil si fra jernsulfid ( $\text{FeS}$ ) og løst sulfid, men ikke pyritt og elementært svovel. Hvis dannelsen av pyritt og andre ikke syreflyktige svovelforbindelser skjer raskt, vil aktiviteten naturligvis kunne bli undervurdert. Vanligvis er imidlertid den syreflyktige fraksjonen størst og som regel tilstrekkelig til å gi et rimelig estimat på aktiviteten.

#### Langtidsforsøk

Disse forsøkene ble stoppet med Zn-Acetat etter 32 dager og sentrifugert før supernatanten ble analysert for sulfat. I dette forsøket ble alle prøvene tilsatt samme mengde sulfat, men fordi vanninnholdet i prøvene var noe forskjellig ble utgangskonsentrasjonen tilsvarende forskjellig.

Tabell 2. Sulfatkonsentrasjoner og målt aktivitet i kulturlag

Lag nr	Start sulfat $\text{mg L}^{-1}$	Slutt sulfat $\text{mg L}^{-1}$	Aktivitet $\text{mg L}^{-1} \text{ dag}^{-1}$
691/1	646	242	12,6
691/2	1115	757	11,2
691/3	1237	1596	-11,2
692/1	615	450	5,2
692/2	538	358	5,6
692/3	646	482	5,1
692/4	583	239	10,7
692/5	780	381	12,5

Den høye sluttkonsentrasjonen av sulfat i 691/3 kan skyldes oksidasjon av sulfid siden glasset var sprukket. Bortsett fra 691/3 er aktiviteten som ble funnet i dette forsøket, tilstrekkelig til at radioaktiv sulfid kunne vært påvist etter 24 timer selv om det ligger helt på grensen. En forklaring kan være at det tar mange dager etter tilsetning av sulfat før aktiviteten øker. I et stabilt uforstyrret system er aktiviteten i stor grad bestemt av den romlige fordelingen av de elementer som inngår i prosessen og hvor raskt diffusjonen av de forskjellige elementene foregår. I dette

tilfellet er de viktigste elementene sulfat og ulike karbonforbindelsene. Ved å manipulere med prøvene vil diffusjonsbegrensningene opphøre for kortere eller lenger tid. Hvorfor det tar mange dager før aktiviteten øker kan skyldes at det først er primærnedbryternes aktivitet som øker. Det tar antagelig litt tid før karbontilgangen øker så mye at det får betydning for aktiviteten til de sulfatreduserende bakteriene. Dette betyr at det var riktig å la prøvene stå i ro i lang tid etter at de var tatt. Selve prosessen med prøvetakingen og fordelingen av delprøver til de ulike undersøkelsene kan i seg selv ha ført til økt aktivitet i prøvene. At det ikke ble påvist aktivitet i kortidssforsøket kan derfor bety at aktiviteten er betydelig lavere i uforstyrrede kulturlag enn det som ble målt i langtidsforsøket.

Betydningen av primærnedbrytere og karbontilgang ble undersøkt nærmere ved hjelp av kulturene som ble tilsatt eddiksyre og cellulose. Eddiksyre kan brytes ned direkte av sulfatreduserende bakterier, mens cellulose først må hydrolyseres og fermenteres av primærnedbrytere til melkesyre, eddiksyre, etanol med mer. Det var ingen målbar forskjell i sulfatkonsentrasjonene etter 5 uker, men det var likevel mulig å påvise forskjeller siden ingen av kulturene som bare var tilsatt sulfat, luktet hydrogensulfid. Luktterskelen for hydrogensulfid er så lav at den kan merkes allerede når konsentrasjonen er  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  luft. 6 av kulturene som var tilsatt eddiksyre luktet hydrogensulfid, mens bare en av kulturene som var tilsatt cellulose, luktet sulfid. Dette var kulturen som var podet, med materiale fra sedimentet med størst grad av sjøvannsinntrenging (691/1). Dette sedimentet har tydeligvis fortsatt en stor populasjon av cellulosenedbrytende mikroorganismer. En slik populasjon kan antagelig bare opprettholdes over lang tid under forhold med god tilgang på cellulose. Denne cellulosen må enten komme fra nedbrytning av organisk materiale i sedimentet, eller med regelmessig inntrenging av sjøvann eller overflatevann som inneholder mye organisk materiale. Hvis det har vært mindre gode bevaringsforhold i denne delen av sedimentet, kan det bety at inntrenging av sjøvann er lite gunstig, men det behøver ikke nødvendigvis bare skyldes økt sulfatreduksjon.

Resultatene for de ulike lag i tabell 2 er ikke direkte sammenlignbare siden prøvene ikke inneholdt like mye sediment. I tabell 3 er resultatene omregnet i forhold til mengde tørrstoff i prøven. Videre har vi brukt ligning (1) til å regne ut hvor mye karbon som blir mineralisert via sulfatreduksjon. Som eksempel, har vi også vist hvor mye cellulose dette tilsvarer, samt hvor lang tid det tar å bryte ned 500 gram cellulose under forsøksbetingelsene i vårt laboratorieforsøk.

Tabell 3. Sulfatreduksjon og karbonmineralisering i kulturlag

Lag nr	mg Sulfat $\text{kg}^{-1}$ $\text{dag}^{-1}$	mg C $\text{kg}^{-1}$ $\text{dag}^{-1}$	mg Cellulose $\text{kg}^{-1} \text{dag}^{-1}$	mg Cellulose $\text{år}^{-1}$	Antall år før all cellulose er nedbrutt
691/1	9,2	2,3	5,7	2091	239
691/2	13,3	3,3	8,3	3044	164
691/3				0	
692/1	5,6	1,4	3,5	1285	389
692/2	7,7	1,9	4,8	1765	283
692/3	5,3	1,3	3,3	1209	414
692/4	23,5	5,9	14,7	5358	93
692/5	14,3	3,6	9,0	3268	153

Nedbrytningen av ren cellulose kan naturligvis gå mye fortere enn dette også under anaerobe forhold, men aktiviteten må likevel karakteriseres som høy. Hvis vi kunne ha målt på uforstyrrede prøver, ville aktiviteten sannsynligvis vært betydelig lavere. Det hadde ikke vært mye godt bevart treverk igjen i disse prøvene hvis nedbrytningen hadde gått så fort som i dette forsøket. Forsøket med merket sulfat tyder også på at aktiviteten var lavere i utgangspunktet. Dette kan indikere at sulfatinntrenging og kanskje spesielt kombinert med andre mekaniske forstyrrelser, vil kunne ha stor betydning for bevaringsforholdene.

Forøvrig foreligger undersøkelser som kan tyde på, at sulfatreduserende bakterier kan bidra til økt hydrolyse av polysakkarider (se bla.a to referanser nedenfor). De undersøkelserne som er referert, er imidlertid gjennomført med den hensikt å optimalisere avfallsbehandling, og resultatene er ikke uten videre overførbare på vår problemstilling. Dersom dette skal belyses nærmere, må det gjennomføres sammenlignende nedbrytningsforsøk med cellulose under sulfatreduserende og metanogene/sulfatbegrensede forhold. Dette kan antagelig best gjennomføres med <sup>14</sup>C-merket cellulose siden konsentrasjonen av mikrobielt tilgjengelig cellulose bør holdes på samme nivå som under naturlige forhold.

Sandeep Pareek , Jun-Ichi Azuma, Yoshihisa Shimizu and Saburo Matsui, 2000. Hydrolysis of newspaper polysaccharides under sulfate reducing and methane producing conditions. Biodegradation, 11(4): 229-237

K.J. Whittington-Jones, J.B. Molwantwab and P.D. Roseb, 2006. Enhanced hydrolysis of carbohydrates in primary sludge under biosulfidogenic conditions. Water Research 40(8):1577-1582