

Drikkevandskvalitet af Grønlandsk indlandsis

Mikkel Bender, Gitte Felding og Carsten Suhr Jacobsen



Drikkevandskvalitet af Grønlandsk indlandsis

Mikkel Bender, Gitte Felding og Carsten Suhr Jacobsen

Indholdsfortegnelse:

Sammendrag:	4
Projektets forløb:	5
Baggrund:	6
Udtagning af prøver	9
Analyser af udvalgte stoffer:	11
Pesticider og metabolitter.....	11
PAH.....	11
PCB.....	11
Analysemetoder.....	11
Mikrobiologiske analyser:	13
Prøvetagningsprocedure:.....	13
Levedygtige kim:.....	13
Smeltning og henstand:.....	13
Karakterisering af hyppigst forekommende bakterier:.....	13
Resultater af kemiske undersøgelser:	14
Udvalgte stoffer:.....	14
Forekomst.....	14
Resultater af mikrobiologiske undersøgelser:	16
Levedygtige bakteriekim:.....	16
Mikroskopiske undersøgelser af prøverne:.....	17
Kimal ved henstand:.....	17
Karakterisering af isolater:.....	18
Konklusion:	21
Kemiske undersøgelser:.....	21
Mikrobiologiske undersøgelser:.....	21

Referencer: 22

Appendiks: 23

Sammendrag:

Projektet "Drikkevandskvalitet af Grønlandsk indlandsis" er et forskningsprojekt finansieret af Greenland Resources A/S. Projektet har til formål at undersøge den kemiske og mikrobielle forurening af indlandsis, der påtænkes anvendt til produktion af drikkevand. Projektet blev igangsat som et tandem projekt til projektet: "Global forurening af den grønlandske indlandsis med miljøfremmede stoffer og tilstedeværelsen af levedygtige mikrobielle kim", der primært er finansieret af DANCEA under Miljøstyrelsen. Mens DANCEA-projektet var fokuseret på betydningen af grænseoverskridende forurening har nærværende projekt været fokuseret på at undersøge isen for mikrobiologiske og kemiske forureninger, som kunne have betydning for den fremtidige anvendelse af isen til drikkevandsformål.

I projektet blev der primært analyseret is fra gletscher 1AH0200. Efter vi havde igangsat analyserne blev det fra Greenland Resources oplyst, at der muligvis var problemer med den in-takte prøve, idet det blev rapporteret fra RISØ at prøven indeholdt synlige rester af silt. GEUS vurderer dog, at den fundne forurening med silt i prøven ikke er af nyere dato og, at den udtagne prøve er repræsentativ for den undersøgte gletscher. Der er senere blevet udtaget en ny prøve som GEUS har modtaget i efteråret 2002. Nærværende rapport bygger på den oprindeligt udtagne prøve.

Prøverne blev indsamlet med anvendelse af aseptiske teknikker og analyseret for indholdet af pesticider, PAH-forbindelser (Polycykliske Aromatiske Hydrocarboner), PCB (PolyChlore-rede Biphenyler) samt levedygtige mikrobielle kim.

Isen fra gletscher 1AH0200 ved Narsassuaq indeholdt ikke påviselige rester af de 72 pesticider, 15 PAH forbindelser samt 7 PCB forbindelser, der blev analyseret for. Isen der er mere end 1000 år gammel indeholdt ikke detekterbar forurening.

De mikrobiologiske undersøgelser viste, at der blev fundet færre dyrkbare bakterier, end de tilladte grænseværdier for dansk drikkevand. Antallet af dyrkbare bakterier var stærkt afhængig af det anvendte dyrkningsmedie, og den temperatur prøverne blev inkuberet ved. Generelt isolerede vi flere bakterier ved lave temperaturer. Smeltning og opbevaring af den smeltede is under iltrige (aerobe) omstændigheder førte til en forventet vækst af bakterier. Den tilgængelige mængde af næringsstoffer var dog under detektionsniveauet hvilket kan forklare at de fremvoksede bakterier når et stabilt niveau.

Ved karakterisering af genopdyrkede isolater under anvendelse af dyrkningsbaserede teknikker har ingen isolater vist nært slægtskab til kendte humane patogener. Denne rapport indeholder kun en karakterisering af et mindre antal de mest almindelige bakterier med anvendelse af 16S rDNA sekventerings teknik.

Projektets forløb:

Projektet blev aftalt og bevilliget i august 2001. I september 2001 rejste to medarbejdere fra GEUS til Grønland (Gitte Felding (kemiker) og Ole Olesen (glaciolog)). Med hjælp fra folk fra Greenland Resources blev en isblok bjærget. Isen blev herefter fragtet til GEUS der herefter undersøgte isen for indhold af kemiske stoffer og mikrobielle kim.

I maj 2002 forelå kemiske data samt de mikrobiologiske undersøgelser af kimtal og henstandsdata. Endelig afslutning af den mikrobiologiske risikovurdering afventede dog en karakterisering af isolerede organismer. Dette arbejde viste sig at være meget tidskrævende da de bakterielle isolater fra isblokken var vanskelige at dyrke, idet nogle isolater kun gror ved lave temperaturer og med en meget lav vækstrate. Dette betyder at hver enkelt nødvendigt dyrkningstrin medfører lange inkuberingstider. Yderligere er en molekylær karakterisering ved hjælp af 16S sekvenser påbegyndt. Det har dog inden endelig karakterisering ved denne teknik været muligt at sandsynliggøre, at de isolerede stammer ikke er humant patogene og dermed ikke forringer drikkevandskvaliteten af den undersøgte is.

Baggrund:

Grønlandsk indlandsis udgør en potentiel ressource for indvinding og eksport af drikkevand. Omfanget og tilgængeligheden af de grønlandske gletschere er i øvrigt beskrevet i GEUS-rapport 2000/13. Nærværende rapport giver en kemisk og mikrobiologisk risikovurdering i forbindelse med udnyttelsen af denne ressource.

Pesticider er en gruppe stoffer, der som bekendt anvendes verden over i forbindelse med optimering af udbyttet fra landbruget. Anvendelsen af pesticider tog for alvor sin begyndelse efter 2. Verdenskrig. Forbruget er alene i et udvidet Europa ca. 300.000 tons aktiv stof årligt.

Der er antageligt produceret mere end 1,5 millioner tons PCB (PolyChlorerede Biphenyler) på verdensplan og produktion kulminerede omkring 1970. PCB'er er meget stabile stoffer. Vandopløseligheden af PCB er meget lav, så et eventuelt indhold i indlandsisen vil formentlig skyldes indlejring af partikler med adsorberet stof.

I rapporten AMAP fra 1998 (AMAP Assessment Report: Artic Pollution Issues. Artic Monitoring and Assessment Program) er tilstedeværelsen af POP's (Persistente Organiske Pollutants) i det arktiske miljø beskrevet. Det er stoffer, som HCH'er, PCB'er, DDT'er, PAH'er, HCB og toxaphener.

Indholdet af stofferne er bestemt i dyr, sediment, hav og sø vand, luft, regnvand og sne. Det er dog meget beskedent, hvad der er af undersøgelser, hvor sneens indhold af miljøfremmede stoffer er undersøgt. I den russiske del af Kara og Laptev havet er der i havisen og snedækket påvist HCH, DDE, DDD, DDT og PCB. Fra Canada, Rusland og Norge er der analyser af luftens og nedbørens (sneens) indhold af POP's (Kallenborn et al., 1991 og Enge et al., 1991), tilsvarende analyser fra Grønland, og Alaska savnes. Den grønlandske indlandsis er analyseret for bly og kviksølv. Følgende ioner er også målt: chlorid, nitrat, sulfat, ammonium og hydrogen.

Organiske chlorholdige pesticider (HCH, DDE, DDT) er påvist i en Alpin gletscher, alderen af isen skønnes at være fra 1981-1988. (Villa et al., 2000). I år 2000 (Masclat et al., 2000) er en undersøgelse af PAH'er (Polycykliske Aromatiske Hydrocarboner) i den grønlandske indlandsis publiceret, prøverne er udtaget i 5 meters dybde og repræsenterer perioden fra 1989 til 1993. Analyserne omfatter 14 forskellige PAH'er, deres oprindelse er blandt andet forbrænding af kul og olie, bilers udstødning, skovbrande etc. Koncentrationerne er opgivet som en sum af 12 PAH'er (undtaget er phenanthren og naphthalen) fra 0,1 til 10 µg/kg. Forureningen antages primært at komme fra Østeuropa, Rusland og Nordamerika.

Kildevand der sælges på flaske må indeholde samme mængde pesticider (0,1 µg/l af et stof og 0,5µg/l totalt), som det vand der leveres som hanevand. Det vil også gælde smeltet indlandsis,

men det vurderes at en væsentlig salgsparameter er at smeltet indlandsis er renere end det vand, der leveres som hanevand i Danmark.

Miljøstyrelsen angiver i drikkevandsdirektivet mikrobiologiske kvalitetskrav, der gælder for vand fra hanen. I fødevarerministeriets bekendtgørelse nr. 67 af 30. jan. 1998 om naturligt mineralvand og kildevand angives det, at de mikrobiologiske kvalitetskrav ved kilden svarer til hvad der er nævnt i drikkevandsdirektivet.

Drikkevandsdirektivet angiver højst tilladelige kimtal (antal dyrkbare bakterier på PCA) til 20 pr. ml. ved dyrkning ved 37°C og 200 pr. ml. ved dyrkning ved 21°C. De vejledende grænseværdier er fire gange lavere, henholdsvis 5 og 50 kim pr. ml. Drikkevandsdirektivet angiver endvidere, at der ikke med den anviste metode må måles nogen coliforme bakterier, termotolerante coliforme bakterier, fækale streptokokker eller sulfitreducerende *Clostridium perfringens*.

Smeltet indlandsis kan ikke umiddelbart defineres som naturligt mineralvand, men måske som kildevand idet bekendtgørelse nr. 67 taler om at *naturligt mineralvand* ”er vand, der er særligt godkendt som sådan efter reglerne i bekendtgørelsen. Vandet skal komme fra en underjordisk kilde, som er beskyttet imod enhver risiko for forurening, og derfor har en naturlig renhed. Naturligt mineralvand skal desuden stamme fra en kilde, hvor vandets beskaffenhed og sammensætning ikke ændres over tid og sted.” Tilsvarende hedder det for *kildevand*: ”kildevand skal ikke godkendes særskilt, men skal overholde flere af de krav, som stilles til naturligt mineralvand”.

Der er i forbindelse med en mikrobiologisk analyse af en bræisblok fundet levedygtige mikrobiologiske kim i isen (Jacobsen, 2000). Det er imidlertid uklart om den undersøgte bræisbloks indhold af levedygtige mikrobielle kim er repræsentativ for indholdet af levedygtige mikrobielle kim i indlandsis, der kan findes ved udtagning af boreprøver. Denne usikkerhed skyldes først og fremmest den metode hvor den undersøgte is er fremskaffet. Den undersøgte isblok er nemlig fisket op at havet og der er derfor en potentiel risiko for at havvand kan have forurennet prøven.

I den internationale litteratur er der publiceret flere artikler, der viser at dyrkbare bakterier kan findes i gletschere, der kan sammenlignes med de grønlandske. I en enkelt artikel sammenlignes der summarisk resultater fra gletschere fra forskellige dele af verden (Christner et al., 2000). I en enkelt analyse af to grønlandske indlandsisprøver, fandt de kun i det ene tilfælde bakterier der kunne isoleres og i det tilfælde mindre end 1 pr. ml.

Fra andre dele af verden er det derimod lykkedes at isolere bakterier indkapslet i is fra en række arktiske og antarktiske habitater (Christner et al., 2000; Skidmore et al., 2000; Gordon et al., 2000). Undersøgelser af levedygtige kim nedfrossent i flere hundrede år gammel is af glacial oprindelse fra Antarktis, Himalayabjergene og Andesbjergene har vist CFU-antal på

helt op til 180 pr milliliter. Generelt gælder det, at disse kim hører til bakterietyper, der er i stand til at danne sporeformer.

Undersøgelser af gletscheris fra arktisk Canada (Skidmore et al. 2000) har påvist en divers dyrkbar flora af coliforme bakterier om end denne dyrkbarhed blev kraftigt hæmmet ved dyrkning ved 37 grader. Forfatterne anfører dog at de observerede større pattedyr på gletscheren og at de fundne bakterier meget vel kan hidrøre fra disse dyr. Bakterier der er adapteret til at leve i kolde miljøer antages at vokse bedst ved lave temperaturer. Samtidig må bakterier der potentielt kunne udgøre en human risiko kunne vokse ved højere temperaturer. Dette betyder at isolering af bakterier fra kolde miljøer som den grønlandske indlandsis samt human risikovurdering af disse, nødvendigvis må indeholde isolering og gendyrkning ved både høje og lave temperaturer.

Andre undersøgelser af gletscheris fra arktisk Canada viser levedygtig tilstedeværelse af både aerobe, nitratreducerende, sulfatreducerende og metanogene bakterier. Antallet af levedygtige bakterier er afhængigt af isens indhold af organisk materiale og dyrkbarheden af organismerne er meget afhængig af dyrkningsmediets sammensætning samt dyrkningstemperatur (Skidmore et al., 2000).

Miljøfarlige stoffer er jævnfør ovennævnte påvist i det arktiske område, men for Grønlands vedkommende savnes der en beskrivelse af, hvilke stoffer der udover PAH'erne er indlejret i indlandsisen. Tilsvarende er der kun usikre rapporter om fund af levedygtige mikrobielle kim i indlandsis fra Grønland. Projektet vil være den første beskrivelse af hvilke mikroorganismer der findes i indlandsisen og hvilke miljøfremmede stoffer, der evt. er globalt spredt og indlejret i indlandsisen.



Udtagning af prøver

Alderen på den grønlandske indlandsis varierer og kan derfor fortælle hvilke globale/lokale forureninger der har været gennem tiden, hvis forureningen da ikke bliver nedbrudt eller på anden vis forsvinder. I september 2001 blev der udtaget prøver fra 4 lokaliteter. Inden udtagningen blev de øverste cm af isen/sneen/firnen fjernet for at minimere evt. kontaminering. Prøverne blev opbevaret i RilsanTM-poser, som er kendetegnet ved ikke at afgive nogen form for afsmitning til prøverne. Temperaturen på udtagningstidspunktet var omkring frysepunktet så prøverne blev opbevaret i flamingo-kasser indtil de kom i frysehus, hvor de lå til de blev sendt til Danmark. Forsendelsen foregik med skib eller fly, i begge tilfælde blev prøverne sendt som frostgods. Prøverne er efter ankomsten blevet opbevaret ved ca. -20°C indtil analyserne er påbegyndt.

Prøven fra gletscher 1AH0200 er i det følgende og i appendiks nummeret som prøve 3, idet vi for sammenligningens skyld har medtaget resultater for de andre isprøver.

En frossen isblok blev udskåret i frostrum. Med henblik på at sikre aseptisk prøvetagning foregik arbejdet i en laminær flow bænk og alle anvendte værktøjer var steriliseret umiddelbart inden arbejdets påbegyndelse. For at kunne detektere evt. kontamination blev sterile kontrolprøver ligeledes placeret i flowbænken under arbejdet.

De udvendige flader af isblokken blev smeltet aseptisk i store bægerglas og sendt til kemiske analyser på Miljøkemi.



Med udgangspunkt i Narsassuaq fik vi udtaget 3 prøver , 2 meget unge og 1 som formentlig er mere end 1000 år gammel, sidstnævnte er udtaget ca. 200 meter over havniveau på gletscheren Qaleralitt Sermia. De 2 øvrige prøver blev udtaget i nærheden i ca. 1200 meters højde begge repræsenterende årene 2000 og 2001.

Tablet over sammenhørende værdier for prøvenummer, udtagningsdato, lokalitet, koordinater, alder, højde over havet og eventuelle bemærkninger.

Prøve nr. Udtaget dato	Lokalitet	Ca. alder i år	Koordinater	Ca. højde over havet i meter	Bemærkninger
1 2-9-2001	Sdr. Strømfjord	>10000	67° 8`N; 60° 7`W	400	Kan være forurenet
2 9-9-2001	Narsassuaq	1	61° 18,92`N; 46° 35,15`W	1250	Station 72
3 9-9-2001	Narsassuaq	>1000	61° 00,00`N; 46° 40,83`W	200	Qaleralitt Sermia
4 9-9-2001	Narsassuaq	1	61° 16,44`N; 46° 47,25`W	1200	Firnområdet

Analyser af udvalgte stoffer:

Pesticider og metabolitter

Der analyseres for følgende ældre pesticider: Aldrin, bromophos, bromophos-ethyl, carbofenthion, chlordan, chlofenvinphos, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDT, pp'-DDT, diazinon, dieldrin, dimethoat, endosulfan I, endosulfan II, endrin, fenitrothion, fonofos, alfa-HCH, beta-HCH, gamma-HC (lindan), delta-HCH, heptachlor, heptachlorepoxyd, heptachlorbenzen, malathion, mirex, parathion, parathion-methyl, pentachlorphenol og tetrachlorvinfos. Samt for de pesticider og nedbrydningsprodukter der typisk indgår i forbindelse med analysering af det grundvand der i Danmark anvendes til drikkevand: Alachlor, atrazin, bentazon, bromoxynil, carbofuran, 4-chlor-2-methylphenol, 4-CPP, cyanazin, 2,4-D, 2,6-DCPP, DE-atrazin, DE-terbutylazin, DIP-atrazin, dicamba, dichlobenil, 2,6-dichlorbenzamid (BAM), 2,4-dichlorphenol, dichlorprop (2,4-DP), dinoseb, DNOC, ethofumesat, fenpropimorph, fluazifop-(p)-butyl, hexazinon, ioxynil, isoproturon, lenacil, MCPA, mechlorprop, metabenzthiazuron, metazachlor, metribuzin, pendimethalin, pirimicarb, propazin, propiconazol, propyzamid, simazin og terbutylazin. Detektionsgrænsen for de fleste pesticider er 0,002 µg/l.

PAH

For PAH'ernes vedkommende medtages de 15, som EPA har på deres liste: Naphthalen, acenaphthylen, acenaphthen, fluoren, phenanthren, anthracen, fluoranthen, pyren, benz(a)anthracen, chrysen/triphenylen, benzofluoranthener (b+j+k), benzo(a)pyren, indeno(1,2,3-cd)pyren, dibenz(ah)anthracen og benzo(ghi)perylen. Med undtagelse af naphthalen (0,02 µg/l) er detektionsgrænsen 0,002 µg/l.

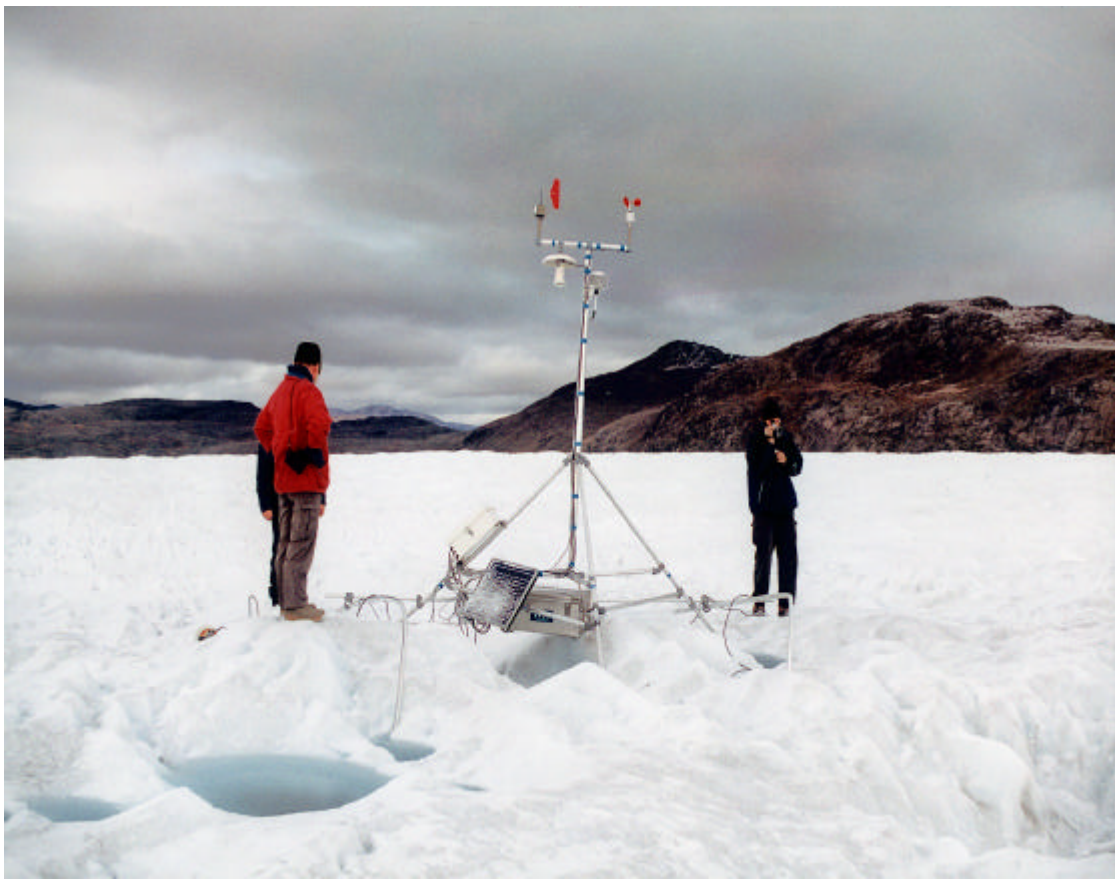
PCB

For PCB'ernes vedkommende analyseres for 7 congenere: PCB # 28, PCB # 52, PCB # 101, PCB # 118, PCB # 138, PCB # 153 og PCB # 180. Detektionsgrænsen er 0,002 µg/l.

Analysemetoder

De kemiske analyser er udført af Miljø-Kemi, som er akkrediteret til at analysere de fleste af stofferne. For at minimere kontamineringen har prøverne inden analysering for pesticider, PCB og PAH henstået et par timer således at det yderste lag er tøet og hældt fra og dermed ikke medtaget i analysen. Der er ikke foretaget nogen form for filtrering, da eventuelle stoffer som måtte være sorberet til partikler i isen ønskes medtaget. For pesticidernes vedkommende foretages en sur og en basisk ekstraktion med dichlormethan, som efterfølgende opkoncentreres og analyseres ved gaskromatografi med massespektrometrisk detektor ved selektiv ion monitoring (GC/MS-SIM). Analyseusikkerheden RSD er 15% ved værdier mindre end 10

gange metodens detektionsgrænse dog op til 50%. Til PAH og PCB analyserne anvendes en sur ekstraktion med dichlormethan efterfulgt af opkoncentrering og analysering ved gaskromatografi med massespektrometrisk detektor ved selektiv ion monitoring (GC/MS-SIM). Analyseusikkerheden RSD er 15% for PCB og 12% for PAH, ved værdier mindre end 10 gange metodens detektionsgrænse dog op til 50%.



Mikrobiologiske analyser:

Prøvetagningsprocedure:

En frossen isblok fra gletscher 1AH0200 blev udskåret i frostrum. Arbejdet foregik i en laminær flow bænk og alle anvendte værktøjer var steriliseret umiddelbart inden arbejdets påbegyndelse. For at kunne detektere evt. kontamination blev sterile kontrolprøver ligeledes placeret i flowbænken under arbejdet.

Levedygtige kim:

Udtagne prøver blev smeltet i sterile glasbeholdere og en delmængde blev opkoncentreret ved hjælp af sterile 0,2 µm filtre. Herefter blev den opkoncentrerede prøve pladet ud på 4 forskellige medier (1/10 TSA, vandagar, coliform petrifilm samt VA petrifilm) og dyrket ved 4 forskellige temperaturer (30°C, 20°C, 5°C, -1°C). Der anvendtes såvel næringsfattige såvel som traditionelle agar-medier i et forsøg på at dække de levedygtige kims specielle krav bedst muligt. Ligeledes er de forskellige udpladningstemperaturer begrundet i potentiel diversitet i temperaturoptimum og temperatur-tolerencer hos de tilstedeværende mikroorganismer. Dannelsen af kolonier på pladerne blev herefter fulgt over en 2 måneders periode. Opkoncentrerede prøver blev yderligere analyseret ved mikroskopi.

Smeltning og henstand:

Delmængder blev hældt i sterile glasbeholdere og stillet til henstand både aerobt og anaerobt ved 3 temperaturer (30°C, 20°C og 5°C). Anaerobe forhold blev løbende kontrolleret hvor det var relevant. Efter 5 ugers henstand blev prøverne udpladet på 1/10 TSA og dyrket ved 10 °C aerobt. Antallet af levedygtige bakteriekim blev over en 18 dages periode og kimtallene blev herefter udregnet.

Karakterisering af hyppigst forekommende bakterier:

Alle isolater blev nedfrosset ved -80°C og opbevares ved denne temperatur på GEUS. Udvalgte isolater er karakteriseret ved konventionelle metoder (kolonimorfologi, -farve, hastighed af kolonifremvækst ved forskellige inkubationstemperaturer, assimilations- og enzym-profil på API 20 NE). Yderligere vil udvalgte isolater blive karakteriseret ved sekventering af 16S-sekvens.

Resultater af kemiske undersøgelser:

Udvalgte stoffer:

Vi fandt ingen spor af pesticider, PCB eller PAH forbindelser i prøve nr. 3 som stammer fra Gletscher 1AH0200. I appendiks 1 kan de detaljerede data for de kemiske analyser ses. Ved nærlæsning af appendiks kan det derimod ses at prøve nummer 4 taget i firnområdet ved Narsassuaq, der består af sne pålejret i 2000 og 2001, indeholder en række kemiske forurenninger. Prøve nummer 1 som er udtaget tæt på "vejen" som går ind til VW's testbane indeholder ikke overraskende nogle lave koncentrationer af PAH'er som blandt andet kan stamme fra bilers udstødning. Prøven indeholder også pentachlorphenol, men i en koncentration lig med detektionsgrænsen, derudover er der opgivet et lavt indhold af dimethoat.

I prøve nr 4 er indholdet af pentachlorphenol meget højt og derfor sikkert. BAM og simazin indholdet er derimod så lavt at det ikke kan tillægges nogen større betydning. Koncentrationerne af de 3 PCB'er er lig eller tæt på detektionsgrænsen og derfor også ret usikre. Alle 15 PAH'er er påvist og i koncentrationer som for de fleste er langt over detektionsgrænsen.

Tablet over prøvernes indhold af miljøfremmede stoffer. Gletscher 1AH0200 er prøve 3.

Prøve nr./ Højde over havet i meter	Lokalitet/ Ca. alder i år	Pesticider Koncentration i µg/l	PCB Koncentration i µg/l	PAH Koncentration i µg/l
3/ 200	Narsassuaq/ >1000	*	*	*

* Der er ikke fundet spor af de undersøgte stoffer.

Forekomst

Fordelingen af chlorholdige organiske forurenninger mellem luft, sne, havvand og de marine pattedyrs fødekæde er beskrevet i AMAP (1998).

PAH'ernes oprindelse kan både være antropogen og naturlig. I følge Masclet et. al (2000) er der følgende sammenhæng mellem de enkelte PAH'er og deres kilder.

Combustion	PAH tracer
Coal	Fluoranthene
Fuel oil	Phenanthrene
Automobiles exhaust	Benzo (ghi)perylene, indenopyrene, coronene
Biomass burning	Pyrene, chrysene, coronene
Boreal forest fires	Retene

I følge Masclet et al (2000) er fluoranthene og pyren de PAH'er som er mest almindelige i byer. De finder også at de er de hyppigst forekommende i sneen. Den gennemsnitlige værdi på årsbasis er opgivet til 1800 pg/g (~1,8 µg/kg).

Resultater af mikrobiologiske undersøgelser:

Levedygtige bakteriekim:

Ved de mikrobiologiske udpladninger blev der foretaget udsåning /udpladning på i alt 80 agarplader og 60 petrifilm. Udpladning blev foretaget på fire forskellige medier;

1) Vandagar

Vandagar er rent steriliseret vand tilsat agar. Dette medie er ekstremt næringsfattigt og bruges normalt til at isolere næringsstoffølsomme bakterier fra oligotrofe miljøer .

2) 1/10 TSA

1/10 TSA er et generelt medie og vores erfaring er at netop dette medie er det bedste til at isolere bakterier fra miljøprøver.

3) Aerobic count plate Petrifilm (3M)

Aerobic count plate Petrifilm (AC) er endnu et generelt medie. Dette medie er designet til kommercielle undersøgelser af kimtal i fødevareindustrien.

4) Coliform Petrifilm (3M)

Coliform petrifilm er et medie der er designet til at tælle coliforme (og dermed potentielt patogene) bakterier.

For at afdække evt. tilstedeværende bakteriers temperatur krav blev samtlige prøver inkuberet ved 4 forskellige temperaturer; 30°C, 10°C, 5°C og -1°C. Kimtallene fra prøverne ved brug af de forskellige medier og temperaturer er vist i nedenstående tabel.

I løbet af de første 14 dage var der kun vokset 6 bakteriekolonier frem ialt, dette svarer til under 0,5 kim pr ml., som kan sammenlignes med kravet til antallet af bakteriekim i ledningsvand i DK hvor der skal være mindre end 200 kim pr ml.

Vi stoppede dog ikke inkuberingen af pladerne, men registrerede fremvækst af bakterier flere gange i løbet af december og januar. Selv efter 2 måneders inkubering kom der ikke flere kim på nogle af medierne ved givne temperaturer, end det tidligere omtalte krav til ledningsvand i DK.

Ved 30°C kom der totalt set færrest kolonier, mens der kom flest ved 10 og 5 grader. Dette stemmer godt overens med den forventede generelle temperatur tolerance og vækstoptimum hos bakterier isoleret fra is. Yderligere kom der på intet tidspunkt kolonier på petrifilmen, der tæller coliforme bakterier. Dette er en indikation af minimal risiko for tilstedeværelse af potentielt patogene stammer.

Kimtal for Aerobic Count Plate petrifilm 30°C, 10°C, 5°C samt vandagar og 1/10 TSA 30°C er ikke medtaget fra januar, da disse desværre overgroedes af skimmelsvamp. Dog var kimtallene på intet tidspunkt inden skimmelvækst i nærheden af den tilladt grænseværdi på 200 kim/ml.

Fra gletcher nr. 1AH0200 er der isoleret følgende bakterier til videre analyse:

Medie / temp	Kim i november	Kim i december	Kim i januar	Total pr 13. jan.
Vandagar 30°C	0/ml	0/ml	-	0/ml
- - 10°C	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
- - 5°C	0/ml	1/ml	3/ml	4/ml
- - -1°C	-	0/ml	2/ml	2/ml
1/10 TSA 30°C	2/ml	2/ml	-	4/ml
- - 10°C	0/ml	46/ml	14/ml	60/ml
- - 5°C	1/ml	65/ml	9/ml	75/ml
- - -1°C	-	0/ml	13/ml	13/ml
C-Petrifilm 30°C	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
- - 10°C	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
- - 5°C	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
- - -1°C	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
AC-Petrifilm 30°C	10/ml	0/ml	-	10/ml
- - 10°C	13/ml	18/ml	-	31/ml
- - 5°C	2/ml	14/ml	-	16/ml
- - -1°C	1/ml	5/ml	12/ml	18/ml

Mikroskopiske undersøgelser af prøverne:

Det var ikke muligt ved mikroskopi at finde en eneste bakterie celle, hvilket kan omregnes til, at der er færre end 1000 celler pr ml. Metoden er ikke følsom, men viser omvendt sammenholdt med kimtallene fra dyrkningerne, at der ikke ligger et stort antal "ikke-dyrkbare" bakterieceller i isen.

Kimtal ved henstand:

Der er foretaget smeltning og henstand både under anaerobe og almindelige iltrige forhold ved 5°C, 10°C og 30°C. Ved udpladning på anaerobe medier kunne vi ikke finde vækst af bakterier i flaskerne der var smeltet og henstillet under anaerobe forhold. I isen smeltet aerobt (med ilt) og opbevaret i almindelige lufttætte flasker, var der stor forskel på hvordan temperaturen påvirkede fremvæksten af kim. Ved at opbevare flaskerne ved 30°C, har vi ikke kunne finde nogen fremvækst af levedygtige kim, mens der i flasker der har stået ved 10°C er ca. 30.000 kim pr. ml. I flasker der har stået ved 5°C sås kraftig fremvækst af bakterier til ca. 200.000

kim pr. ml. Disse forsøg er gennemført med tre gentagelser og alle kontroller har vist, at der ingen forureninger er indtruffet.

Det er således sandsynligt at bakterier fra isen kan udnytte de få næringsstoffer, der er tilstede i smeltevandet og kan opnå relativt høje tætheder ved længere tids henstand ved lave temperaturer.

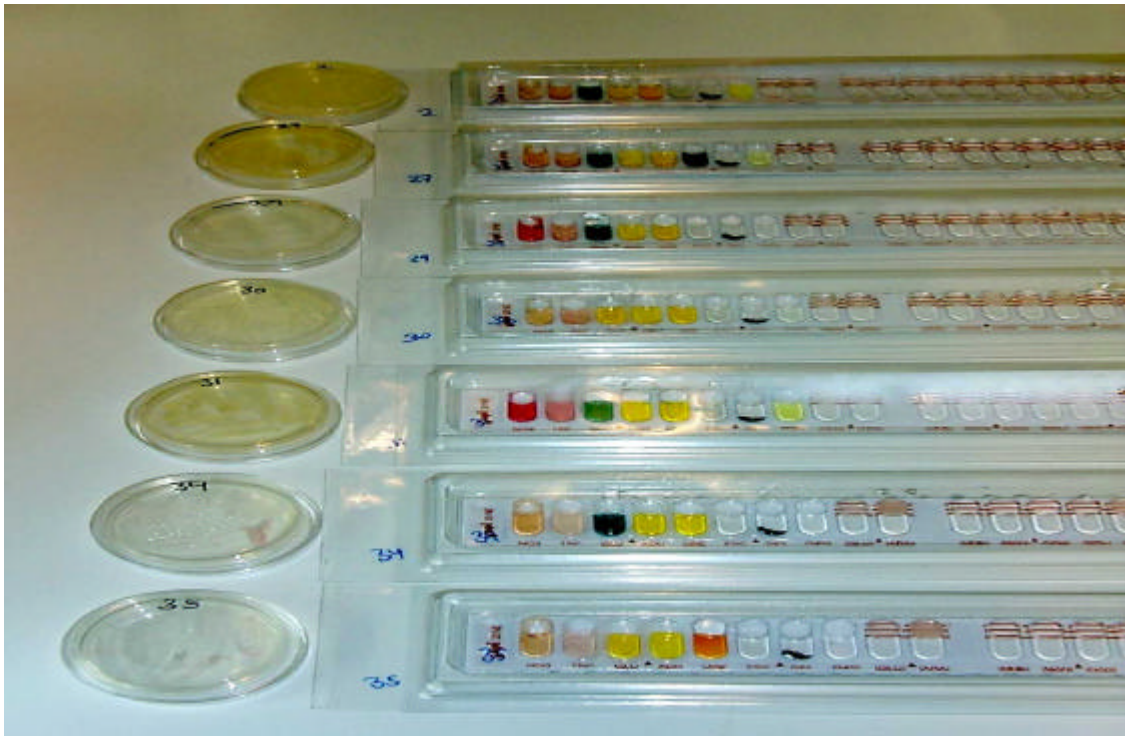
Karakterisering af isolater:

De isolerede kolonier blev nedfrosset i 50% glycerol og gemt ved -80°C . Ved denne metode kan bakterier holdes i dvale og gemmes over lange perioder. Nedfrosne bakteriestammer opbevares ved denne temperatur på GEUS. Samtlige isolater blev herefter vækket på 1/10 TSA plader inkuberet ved 5°C og 20°C . Ikke alle isolater kunne vokse op igen og det var kun muligt at re-dyrke 10 af isolaterne fra isblokken. Dette kan skyldes at mediet og/eller temperatur forholdene ikke er de samme som de oprindelige isoleringsforhold. Endvidere kan det tænkes at flere bakterier ikke har kunnet overleve nedfrysningen i glycerol. Disse genopdyrkede isolater er karakteriseret ved konventionelle metoder (kolonimorfologi, -farve, hastighed af kolonifremvækst ved forskellige inkubationstemperaturer, assimilations- og enzym-profil på API 20 NE). Yderligere vil udvalgte isolater blive karakteriseret ved sekventering af 16S-sekvens.

Flere af stammerne var ikke i stand til at vokse ved høje temperaturer (20°C) eller voksede hurtigere ved 5°C end ved 20°C . Endvidere sås en tydelig sammenhæng mellem isolerings-temperatur og evne til at gro ved lav temperatur. Flere af stammerne var pigmenterede og dannede farvestrålende gullige kolonier. Indledende karakteristika af de 10 genopdyrkede stammer ved inkubering ved 5°C og 20°C :

GEUS nr.	Oprindelige isoleringsforhold			20 ° C		5 ° C	
	Oprindelse	Temp. i C	Fra medie	Vækst 1 uge	Farve	Vækst 1 Uge	Farve
1	IS	5	TSA	Ingen		Små	
22	IS	10	TSA	Ingen		Mellem	hvide
29	IS	30	AC-petrfilm	Små	hvide	Ingen	
30	IS	30	AC-petrfilm	Små	gule	Ingen	
31	IS	30	TSA	Store	gule	Ingen	
71	IS	5	AC-petrfilm	Ingen		Små	hvide
88	IS	30	AC-petrfilm	Små	hvide	Ingen	
174	IS	10	VA	Ingen		Små	
194	IS	-1	VA	Ingen		Små	hvide
202	IS	-1	AC-petrfilm	Ingen		Små	

Indledende karakterisering af genopdyrkede isolater.



Inokulerende API 20 NE strimler.

Karakterisering på API-strimler:

For at undersøge evt. tilstedeværelse af kendte humane patogener blandt de genopdyrkede isolater undersøgte disse ved hjælp af API 20 NE enzymprofil og assimilationsstrimler. API 20 NE er specialdesignede til at identificere en lang række bakterier herunder kendte patogener.

Isolaterne fra isen kunne desværre ikke identificeres på API 20 NE. Dog er det derfor usandsynligt at nogle af disse isolater er humane patogener.

Sekventering:

Den eneste mulighed for at identificere de øvrige isolater er ved at sekventere deres 16S ribosomale DNA sekvens. Disse sekvenser giver et genetisk fingeraftryk af bakteriestammen og er en særdeles sikker og velafprøvet identifikationsmetode. Undersøgelserne foretages i øjeblikket på NOVOzymes og forventes afsluttet medio februar.

Indtil nu er to stammer blevet sekventeret og identificeret som været meget tæt beslægtede med henholdsvis *Sphingomonas* sp. BF14 (stamme nr. 29) og *Herbaspirillum seropedicae* (stamme nr. 71). Heller ikke disse stammer er kendte humane patogener.

GEUS nr.	Oprindelige isole-		Identitet på API-20 NE		Identitet ved 16S sekventering
	ringsforhold	Temp. i C	Eller mikroskopi		
	Oprindel-	Temp. i C	Fra medie		
	se				
1	IS	5	TSA	Ukendt (- vækst)	
22	IS	10	TSA	<i>Gær</i> (Mikroskopi)	
29	IS	30	AC-petrfilm	Ukendt (- vækst)	<i>Sphingomonas</i> sp.
30	IS	30	AC-petrfilm	Ukendt (- vækst)	
31	IS	30	TSA	Ukendt (lille vækst)	
71	IS	5	AC-petrfilm	Ukendt (- vækst)	<i>Herbaspirillum</i> <i>Seropedicae</i>
88	IS	30	AC-petrfilm	Ukendt (- vækst)	
174	IS	10	VA	Ukendt (- vækst)	
194	IS	-1	VA	Ukendt (- vækst)	
202	IS	-1	AC-petrfilm	Ukendt (- vækst)	

Karakterisering ved API 20 NE og sekventering.

Konklusion:

Kemiske undersøgelser:

Der er ikke påvist nogen miljøfremmede stoffer af betydning i prøven fra gletscher 1AH0200 som repræsenterer en meget gamle is.

I en af de yngre prøver (der er undersøgt i et andet projekt, se appendiks) er der derimod påvist PAH'er i forholdsvis høje koncentrationer.

Mikrobiologiske undersøgelser:

Mikrobiologiske undersøgelser viste et lavt antal mikrobiologiske kim i isen. Disse kim udviser en betydelig grad af kulde tilpasning og det er bemærkelsesværdigt at flest bakterier isoleres ved lave temperaturer, samt at flere af disse bakterier ikke kan dyrkes ved høje temperaturer. I forhold til anvendelsen af isen til human konsum er det overordnet set betryggende at bakterierne ikke kan vokse ved høje temperaturer. Yderligere fandt vi ingen coliforme kolonier i isen og ingen isolater viste slægtskab med kendte humane patogener ved dyrkning på API 20 NE eller ved sekventering.

Hvis isen smeltes og opbevares med ilt tilstede fører det til en opblomstring af de få bakteriekim der findes i isen. Is smeltet og henstillet anaerob (uden ilt) udvikler ingen anaerobe kim.

Referencer:

AMAP (1998) Assessment Report: Arctic Pollution Issues. Arctic Monitoring and Assessment Program. ISBN 82-7655-061-4

Christner C.B., E. Mosley-Thomsen, L.G. Thomsen, V. Zagorodnov, K. Sandman, J.N. Reeve, (1999). Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. ICARUS **144**, 479-485.

Enge E.K., G. Christensen, R. Kallenborn, D. Herzke & T. Skotvold (2001) Persistent α -organic pollutants in snow and melt water from Bjørnøya (Bear Island). Organohalogen compounds, P217, 52: 467-470.

Gordon, D.A., J. Priscu, S. Giovannoni, (2000). Origin and phylogeny of microbes living in permanent antarctic lake ice. Microbial Ecology **39**, 197-202.

Jacobsen, C.S. (2000). GEUS rapport 2000/86.

Kallenborn R., G. Christensen, E.K. Enge, D. Herzke, M. Schlabach & T. Skotvold (2001) Persistent organic pollutants in ambient air and fog at Bjørnøya (Bear Island). Organohalogen compounds 52: 413-416

Masclet, P., Hoyau, V., Jaffrezo, J.L. Cachier, H. (2000). Atmospheric Environment, **34**, 3195-3207.

Skidmore, M. L., J.M. Foght, M.J. Sharp, (2000). Microbial life beneath a high arctic glacier Appl. Environ. Microb. **66**, 3214-3220.

U.S. Geological Survey (1995) Fact Sheet FS-152-95)

Villa, S., Maggi, V., Bolzacchini, E., Rindone, B., Vighi, M., Belloli, R. (2000). Prepr. Ext. Abstr. ACS Natl. Meet., Am. Chem. Soc., Div. Environ. Chem., **40** (1), 397-399.

Appendiks:

Analyserapport

Depositions projekt

Analyse af is og sne

Rekvirent: **GEUS**
 Gitte Felding
 Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse
 Thoravej 8
 2400 København NV

Dato: 7. maj 2002

Udført af: MILJØ-KEMI, Dansk Miljø Center A/S
 Holsbjergvej 42, DK-2620 Albertslund

Nis Hansen
udviklingschef

Yvonne
sektionsleder

Simonsen

Appendiks-fortsat

Prøvemateriale

Prøverne var mærket:

- Prøve 1
- Prøve 2
- Prøve 3
- Prøve 4

Prøverne er modtaget i rilsanposer og er opbevaret i fryser (-20°C) indtil analyserne er påbegyndt.

Prøverne er efter aftale analyseret efter følgende program:

- Pesticider
- PAH
- PCB

For enkeltstoffer se resultattabellerne side 4-9.

Analyserne er udført i perioden 08.03.2002 - 03.05.2002.

Appendiks-fortsat

Analysemetoder:

For at minimere kontaminering har prøverne efter udtagelsen af fryser henstået et par timer, og det yderste lag er tøet, hældt fra og ikke medtaget i analysen.

Derefter er prøven delt og en delprøve taget i analyse. Analyserne er udført på den homogeniserede delprøve (totalprøve).

Pesticider (sur) i vand (MK-2270)

Princip: Vandprøven pH justeres og ekstraheres 3 gange med dichlormethan. Det samlede ekstrakt inddampes. Ekstraktet methyleres og analyseres ved gaskromatografi med massespektrometrisk detektor (GC/MS-SIM). Pentachlorphenol medtages efter denne metode.

Analyseusikkerhed: RSD 15%, ved værdier mindre end 10 gange metodens detektionsgrænse dog op til 50%.

Pesticider (basisk) i vand (MK-2271)

Princip: Vandprøven pH justeres og ekstraheres 3 gange med dichlormethan. Det samlede ekstrakt inddampes og analyseres ved gaskromatografi med massespektrometrisk detektor (GC/MS-SIM).

Analyseusikkerhed: RSD 15%, ved værdier mindre end 10 gange metodens detektionsgrænse dog op til 50%.

PAH og PCB i vand (MK-2260)

Princip: Prøven gøres sur til pH 2 og ekstraheres med dichlormethan. Efter indampning analyseres ekstraktet ved gaskromatografi med massespektrometrisk detektor ved selektiv ion monitoring (GC/MS-SIM).

Analyseusikkerhed: RSD 12% for PAH og 15% for PCB, ved værdier mindre end 10 gange metodens detektionsgrænse dog op til 50%.

Appendiks-fortsat

Is- og sneprøver

Enhed: µg/liter	Prøve 1	Prøve 2	Det.grænse
Pesticider:			
aldrin	-	-	0,002
bromophos	-	-	0,002
bromophos-ethyl	-	-	0,002
carbofenothion	-	-	0,002
chlordan	-	-	0,002
chlorfenvinphos	-	-	0,002
op'-DDD	-	-	0,002
pp'-DDD	-	-	0,002
op'-DDE	-	-	0,002
pp'-DDE	-	-	0,002
op'-DDT	-	-	0,002
op'-DDT	-	-	0,002
diazinon	-	-	0,005
dieldrin	-	-	0,002
dimethoat	0,014	-	0,01
endosulfan I	-	-	0,005
endosulfan II	-	-	0,005
endrin	-	-	0,005
fenitrothion	-	-	0,002
fonofos	-	-	0,002
alfa-HCH	-	-	0,002
beta-HCH	-	-	0,002
gamma-HC (lindan)	-	-	0,002
delta-HCH	-	-	0,002
heptachlor	-	-	0,002
heptachloreoxid	-	-	0,002
hexachlorbenzen	-	-	0,002
malathion	-	-	0,002
mirex	-	-	0,002
parathion	-	-	0,005
parathion-methyl	-	-	0,002
pentachlorphenol	0,002	-	0,002
tetrachlorinfos	-	-	0,002

-: Mindre end den anførte detektionsgrænse.

Appendiks - fortsat

Is- og sneprøver

Enhed: µg/liter	Prøve 1	Prøve 2	Det.grænse
Pesticider (fortsat):			
alachlor	-	-	0,002
atrazin	-	-	0,002
bentazon	-	-	0,002
bromoxynil	-	-	0,002
carbofuran	-	-	0,02
4-chlor-2-methylphenol	-	-	0,003
4-CPP	-	-	0,002
cyanazin	-	-	0,002
2,4-D	-	-	0,002
2,6-DCPP	-	-	0,002
DE-atrazin	-	-	0,002
DE-terbutylazin	-	-	0,002
DIP-atrazin	-	-	0,01
dicamba	-	-	0,02
dichlobenil	-	-	0,02
2,6-dichlorbenzamid (BAM)	-	-	0,002
2,4-dichlorphenol	-	-	0,02
dichlorprop (2,4-DP)	-	-	0,002
dinoseb	-	-	0,002
DNOC	-	-	0,01
ethofumesat	-	-	0,002
Fenpropimorph	-	-	0,002
Fluazifop-(p)-butyl	-	-	0,002
hexazinon	-	-	0,005
Ioxynil	-	-	0,002
Isoproturon	-	-	0,002
Lenacil	-	-	0,005
MCPA	-	-	0,002
mechlorprop	-	-	0,002
metabenzthiazuron	-	-	0,002
metazachlor	-	-	0,002
metribuzin	-	-	0,005

-: Mindre end den anførte detektionsgrænse.

Appendiks - fortsat

Is- og sneprøver

Enhed: µg/liter	Prøve 1	Prøve 2	Det.grænse
Pesticider (fortsat):			
pendimethalin	-	-	0,005
pirimicarb	-	-	0,002
propazin	-	-	0,002
propiconazol	-	-	0,005
propyzamid	-	-	0,002
Simazin	-	-	0,002
Terbutylazin	-	-	0,005
PAH:			
naphthalen	0,025	-	0,02
acenaphthylen	-	-	0,002
acenaphthen	-	-	0,002
fluoren	0,002	-	0,002
phenanthren	-	-	0,005
anthracen	-	-	0,002
Fluoranthen	0,002	-	0,002
pyren	-	-	0,002
benz(a)antracen	-	-	0,002
chrysen/triphenylen	0,003	-	0,002
benzofluoranthener (b+j+k)	0,003	-	0,002
benzo(a)pyren	-	-	0,002
indeno(1,2,3-cd)pyren	-	-	0,002
dibenz(ah)anthracen	-	-	0,002
benzo(ghi)perylen	-	-	0,002
PCB:			
PCB # 28	-	-	0,002
PCB # 52	-	-	0,002
PCB # 101	-	-	0,002
PCB # 118	-	-	0,002
PCB # 138	-	-	0,002
PCB # 153	-	-	0,002
PCB # 180	-	-	0,002

-: Mindre end den anførte detektionsgrænse.

Appendiks-fortsat

Is- og sneprøver

Enhed: µg/liter	Prøve 3	Prøve 4	Det.grænse
Pesticider:			
Aldrin	-	-	0,002
bromophos	-	-	0,002
bromophos-ethyl	-	-	0,002
carbofenothion	-	-	0,002
chlordan	-	-	0,002
chlorfenvinphos	-	-	0,002
op'-DDD	-	-	0,002
pp'-DDD	-	-	0,002
op'-DDE	-	-	0,002
pp'-DDE	-	-	0,002
op'-DDT	-	-	0,002
op'-DDT	-	-	0,002
diazinon	-	-	0,005
dieldrin	-	-	0,002
dimethoat	-	-	0,01
endosulfan I	-	-	0,005
endosulfan II	-	-	0,005
endrin	-	-	0,005
fenitrothion	-	-	0,002
fonofos	-	-	0,002
alfa-HCH	-	-	0,002
beta-HCH	-	-	0,002
gamma-HC (lindan)	-	-	0,002
delta-HCH	-	-	0,002
heptachlor	-	-	0,002
heptachloreoxid	-	-	0,002
hexachlorbenzen	-	-	0,002
malathion	-	-	0,002
mirex	-	-	0,002
parathion	-	-	0,005
parathion-methyl	-	-	0,002
pentachlorphenol	-	6,1	0,002
tetrachlorvinfos	-	-	0,002

-: Mindre end den anførte detektionsgrænse.

Appendiks - fortsat

Is- og sneprøver

Enhed: µg/liter	Prøve 3	Prøve 4	Det.grænse
Pesticider (fortsat):			
alachlor	-	-	0,002
atrazin	-	-	0,002
bentazon	-	-	0,002
bromoxynil	-	-	0,002
carbofuran	-	-	0,02
4-chlor-2-methylphenol	-	-	0,003
4-CPP	-	-	0,002
cyanazin	-	-	0,002
2,4-D	-	-	0,002
2,6-DCPP	-	-	0,002
DE-atrazin	-	-	0,002
DE-terbutylazin	-	-	0,002
DIP-atrazin	-	-	0,01
dicamba	-	-	0,02
dichlobenil	-	-	0,02
2,6-dichlorbenzamid (BAM)	-	0,009	0,002
2,4-dichlorphenol	-	-	0,02
dichlorprop (2,4-DP)	-	-	0,002
dinoseb	-	-	0,002
DNOC	-	-	0,01
ethofumesat	-	-	0,002
Fenpropimorph	-	-	0,002
Fluazifop-(p)-butyl	-	-	0,002
hexazinon	-	-	0,005
Ioxynil	-	-	0,002
Isoproturon	-	-	0,002
Lenacil	-	-	0,005
MCPA	-	-	0,002
mechlorprop	-	-	0,002
metabenzthiazuron	-	-	0,002
metazachlor	-	-	0,002
metribuzin	-	< 0,05 *	0,005

-: Mindre end den anførte detektionsgrænse.

*: Forhøjet detektionsgrænse på grund af interferens.

Appendiks-fortsat

Is- og sneprøver

Enhed: µg/liter	Prøve 3	Prøve 4	Det.grænse
Pesticider (fortsat):			
pendimethalin	-	-	0,005
pirimicarb	-	-	0,002
propazin	-	-	0,002
propiconazol	-	-	0,005
propyzamid	-	-	0,002
Simazin	-	0,003	0,002
Terbutylazin	-	-	0,005
PAH:			
naphthalen	-	0,025	0,02
acenaphthylen	-	0,014	0,002
acenaphthen	-	0,028	0,002
fluoren	-	0,033	0,002
phenanthren	-	0,41	0,005
anthracen	-	0,033	0,002
Fluoranthren	-	0,65	0,002
pyren	-	0,35	0,002
benz(a)antracen	-	0,11	0,002
chrysen/triphenylen	-	0,30	0,002
benzofluoranthener (b+j+k)	-	0,51	0,002
benzo(a)pyren	-	0,17	0,002
indeno(1,2,3-cd)pyren	-	0,16	0,002
dibenz(ah)anthracen	-	0,041	0,002
benzo(ghi)perylen	-	0,17	0,002
PCB:			
PCB # 28	-	-	0,002
PCB # 52	-	0,002	0,002
PCB # 101	-	0,003	0,002
PCB # 118	-	-	0,002
PCB # 138	-	0,002	0,002
PCB # 153	-	-	0,002
PCB # 180	-	-	0,002

-: Mindre end den anførte detektionsgrænse.

Appendiks – fortsat

Isolerede mikroorganismer; Vækst af isolater og indledende karakterisering.

GEUS nr.	Oprindelige isoleringsforhold			Vækket ved 20°C på 1/10 TSA			Vækket ved 5° på 1/10 TSA		
	Hvorfra	Temp. i C	Fra medie	Vækst 7dg.	Farve	Kommentar	Vækst 7dg.	Farve	kommentar
70	F	30	TSA	store		transparent	små		transparent
81	F	30	TSA	store		transparent	små		transparent
82	F	30	TSA	store	Gule				
83	F	30	TSA	store	Gule				
84	F	30	TSA	store	Gule				
86	F	30	TSA	store	Gule				
87	F	10	C-petrifilm	store	hvide		små	Hvide	
163	F	-1	TSA	store	lyserøde		store	Lyserøde	
167	F	-1	AC-petrifilm	store	hvide		store	Hvide	
168	F	-1	AC-petrifilm				små	transparent	
169	F	-1	AC-petrifilm	små	hvide	transparent	små	Hvide	transparent
179	F	10	VA-TSA		højgul				
1	IS	5	TSA				meget små		
22	IS	10	TSA				mellem	Hvide	
29	IS	30	AC-petrifilm	små	hvide				
30	IS	30	AC-petrifilm	små	gule				
31	IS	30	TSA	store	gule				
71	IS	5	AC-petrifilm				små	Hvide	
88	IS	30	AC-petrifilm	små	hvide				
174	IS	10	VA-TSA						
194	IS	-1	VA - TSA				små		hvide
202	IS	-1	AC-petrifilm						
2	S.S.	5	TSA	små	hvide		små	Hvide	
27	S.S.	10	TSA	store	højgule		store	Højgule	
34	S.S.	30	AC-petrifilm	bittesmå	røde	hårde			
35	S.S.	30	AC-petrifilm	bittesmå	røde	hårde			
56	S.S.	10	AC-petrifilm	store	solgul		små	Solgul	
57	S.S.	10	AC-petrifilm	store	lyserøde		store	Lyserøde	
58	S.S.	10	AC-petrifilm	store	hvide		små	Hvide	
59	S.S.	10	AC-petrifilm	store	orange		små	Gulorange	
60	S.S.	10	AC-petrifilm		hvide	transparent	små	Hvide	transparent
61	S.S.	10	AC-petrifilm	store	orange		små	Orange	
67	S.S.	5	TSA	store	orange		små	Orange	
68	S.S.	5	TSA	store	orange		små	Orange	
69	S.S.	5	AC-petrifilm	store	lyserøde		store	Lyserøde	
80	S.S.	5	AC-petrifilm		hvide	transparent		Hvide	transparent
110	S.S.	10	AC-petrifilm	små	hvide				
113	S.S.	10	TSA	stor	gul				
141	S.S.	5	AC-petrifilm				små	Hvide	
162	S.S.	-1	AC-petrifilm	store	lyserøde		store	Lyserøde	
191	S.S.	-1	AC-petrifilm	små	hvide		små	Hvide	
192	S.S.	-1	AC-petrifilm				gule	Små	

Appendiks – fortsat

Isolerede mikroorganismer; Vækst af isolater på API 20 NE strimler:

GEUS nr.	Hvor- fra	Temp. i C	Enzy										Vækst								
			NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT
70	F	30	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
81	F	30	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
82	F	30	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
83	F	30	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
84	F	30	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
86	F	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	F	10	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
163	F	-1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167	F	-1	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
168	F	-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
169	F	-1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
179	F	10	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	IS	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	IS	10	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
29	IS	30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	IS	30	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	IS	30	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	IS	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	IS	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
174	IS	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
194	IS	-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
202	IS	-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	S.S.	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	S.S.	10	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	S.S.	30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
35	S.S.	30	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
56	S.S.	10	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	S.S.	10	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
58	S.S.	10	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
59	S.S.	10	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	S.S.	10	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
61	S.S.	10	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
67	S.S.	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
68	S.S.	5	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
69	S.S.	5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
80	S.S.	5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	S.S.	10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	S.S.	10	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
141	S.S.	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
162	S.S.	-1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
191	S.S.	-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
192	S.S.	-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Appendiks-fortsat

Isolerede mikroorganismer; Ompodet på 1/10 TSA og identificeret ved sekventering:

GEUS nr.	Hvorfra	Temp. i C	Vækst 2 dg. 20 °C	Vækst 2 dg. 5°C	Vækst 10 dg. 5°C	Identifikation
70	F	30	+	(+)		Rape rhizosphere Bacterium
81	F	30	+	(+)		Rape rhizosphere Bacterium
82	F	30	+			Micrococcus luteus
83	F	30	+			
84	F	30	+			
86	F	30	+			
87	F	10	+	(+)		Gær (Mikroskopi)
163	F	-1	+	(+)		Gær (Mikroskopi)
167	F	-1	+	+		Gær (Mikroskopi)
168	F	-1		+		
169	F	-1	(+)	(+)		
179	F	10	+			
1	IS	5			+	
22	IS	10		+		Gær (Mikroskopi)
29	IS	30	((+))			Sphingomonas sp. BF14
30	IS	30	(+)			
31	IS	30	(+)			
71	IS	5			lille vækst	Herbaspirillum seropedicae
88	IS	30	((+))			
174	IS	10			+	
194	IS	-1		+		
202	IS	-1			+	
2	S.S.	5	(+)	(+)		Gær (Mikroskopi)
27	S.S.	10	+	+		Sphingomonas sp. BF14
34	S.S.	30	(+)			
35	S.S.	30	(+)			
56	S.S.	10	(+)	(+)		Sphingomonas sp. BF14
57	S.S.	10	+	+		
58	S.S.	10	((+))			Arthrobacter sp.
59	S.S.	10	+	+		
60	S.S.	10	(+)	(+)		Arthrobacter sp.
61	S.S.	10	+	(+)		Sphingomonas sp.
67	S.S.	5	(+)	(+)		
68	S.S.	5	(+)	(+)		
69	S.S.	5	+			Gær (Mikroskopi)
80	S.S.	5	+	+		
110	S.S.	10	(+)		+	
113	S.S.	10	+			
141	S.S.	5		ingen vækst ???		
162	S.S.	-1	+	+		Gær (Mikroskopi)
191	S.S.	-1	(+)	(+)		
192	S.S.	-1	((+))	(+)		Bacterium CS117 Cryobacterium