



Bruk av den mikrobielle sammensetningen i det marine miljøet som en indikator på oljeforurensning

RF-1999/019



Vår referanse: 642/65 48 13	Forfatter(e): Grethe Kjeilen og Samuel D. Olsen	Versjonsnr. / dato: Vers. 1 / 25. 02 99
Ant. sider: 34	Faglig kvalitetssikrer: Odd Ketil Andersen	Gradering: Åpen
ISBN: 82-7220-969-1	Oppdragsgiver(e): Olje og Energi Departementet (OED)	Åpen fra (dato): 25. 02 99
Forskningsprogram:	Prosjekttittel: 98H52: Naturlig mikrobiell nedbrytning av olje i marine miljøer	

Emne:

Med bakgrunn i tilgjengelig informasjon om metoder for å se på mikrobiell sammensetning i marine miljøer er mulighetene for å bruke den mikrobielle statusen til det marine miljøet som en indikator på oljeforurensning blitt vurdert.

Betydningen av mikroorganismer i det marine miljø, metoder for å se på antall og sammensetning av mikroorganismer, mikrobiell aktivitet, og genetisk diversitet av mikroorganismer, er presentert. Endringer i den mikrobielle sammensetningen som forekommer som et resultat av en ytre påvirkning (oljeforurensning), og metoder som fanger opp disse endringene er videre diskutert. Egenskaper av olje, nedbrytning av olje (både kjemisk og mikrobielt), og metoder for å se på nedbrytning av olje er også omhandlet.

Med bakgrunn i det som fremkom gjennom litteraturstudiet, har hensikten med prosjektet har vært å vurdere om det er mulig å etablere en enkel screeningmetode som, med utgangspunkt i endringer i/statusen til den mikrobielle populasjonen, kan gi en raskt og presis indikasjon på forurensningstilstanden til et miljø. En slik metode kan erstatte eller være med å redusere omfanget av andre analyser som gjennomføres i forbindelse med kartlegging og overvåking av oljesøl.

Emne-ord:

marint miljø, mikrobiell sammensetning, oljeforurensning, nedbrytning av olje

RF - Rogalandforskning er sertifisert etter et kvalitetssystem basert på NS - EN ISO 9001


Prosjektleder
Grethe Kjeilen


for RF - Miljø og næringsutvikling
Kåre Netland

Innhold

SUMMARY	iii
1 BAKGRUNN	1
2 INNLEDNING	1
2.1 Mikroorganismer i miljøet.....	2
2.1.1 Sammensetning og diversitet av mikroorganismer i marint miljø	2
2.1.1.1 Mikroorganismer som bryter ned hydrokarboner	4
2.1.2 Betydningen av mikroorganismer i marint miljø.....	5
2.1.3 Metoder for å se på den mikrobielle strukturen til miljøet	6
2.1.3.1 Metoder for å bestemme tilstedeværelse og antall av mikroorganismer	7
2.1.3.2 Metoder for å bestemme mikrobiell aktivitet.....	8
2.1.3.3 Metoder for å se på genetisk mikrobiell diversitet.....	9
2.2 Olje i marint miljø	13
2.2.1 Egenskaper til olje	13
2.2.1.1 Element sammensetning	13
2.2.1.2 Molekylære forbindelser i olje	13
2.2.1.3 Biomarkører	14
2.2.1.4 Metaller	14
2.2.1.5 Kategorier av olje	15
2.2.1.6 Rekkefølgen av kjemiske komponenter som fjernes ved biodegradering	15
2.2.2 Forandring i sammensetning og giftighet ved søl av råolje	16
2.2.3 Vitrifisering av olje	17
2.2.3.1 Fordampning	17
2.2.3.2 Emulsifisering/Interaksjon med sjøvann	17
2.2.3.3 Foto-oksidering	17
2.2.4 Fysikalske egenskaper til råolje.....	17
2.2.4.1 Tetthet eller API	17
2.2.4.2 Viskositet.....	18
2.2.4.3 Farge.....	18
2.2.5 Nedbrytning av olje.....	19
2.2.5.1 Mikrobiell nedbrytning av olje	19
2.2.5.2 Effekter av biodegradering på oljens innhold av jern	20
2.2.6 Metoder for å se på nedbrytning av olje	20
2.2.6.1 Metoder som er anvendt ved et oljesøl (SEC HPLC, GC, GC-MS, ICP-MS)	20
2.2.6.2 Informasjon om nedbrytningsgrad av olje fra GC (Gasskromatografi).....	21
2.2.6.3 Informasjon fra GC-MS om grad av biodegradering	23
2.2.6.4 Informasjon om grad av biodegradering basert på syreinnholdet i olje.....	23

2.2.6.5 Metall- og svovelinnhold som indikasjon på biodegraderingsgrad.....	23
3 DISKUSJON; METODEVALG OG INFORMASJON	23
3.1 Metoder for å undersøke mikrobielle samfunn	23
3.2 Kjemiske metoder for å se på oljenedbrytning.....	24
4 MIKROBIELL SAMMENSETNING SOM INDIKATOR PÅ FORURENSING	25
4.1 Formål med ny metode for å vurdere forurensing.....	25
4.2_Hvordan kan den mikrobielle sammensetningen brukes som en indikator på forurensing?	26
5 FORSLAG TIL VIDEREFØRING	27
5.1 Eksperimentell tilnærming	28
6 REFERANSER	29

Summary

It is well known that oil pollution may have severe deleterious effects on biological life. This study has examined the evidence in the literature which shows that microbial composition in sediments or water can be used as indicators that the marine environment has been exposed to oil pollution. Alternately, the dominating microbial processes in these samples could also be applied as evidence of exposure to oil pollution. Literature regarding the microbial composition of marine environments, marine hydrocarbon degrading microorganisms and degradation patterns, methods for determining cell numbers, metabolic activity, genetic and phylogenetic diversity of microbial populations have been reviewed. Chemical properties of crude oil and the chemical methods used to determine the extent that crude oil has degraded is briefly summarised. Suggestions are made based on information in the literature on how chemical components such as carboxylic acids may be used to give evidence about the type of contaminant, the extent of degradation and the metabolic pathway followed during degradation. The report concludes with recommendations on how these findings and suggestions need to be applied and further substantiated.

Microorganisms which are capable of breaking down hydrocarbons are found in most environments (cold as well as temperate zones). It is observed that the concentration of hydrocarbon degrading bacteria (HDB) increases in response to any presence of hydrocarbons. The taxonomic diversity of these HDB's is large. The classes of hydrocarbons affects which microorganisms are mobilised. Added to this compositional influence, variations increase with the aerobic and anaerobic degradation processes, the many interactions between microorganisms, virus, algae, higher plants and animals as well as the influence of the chemical environment (light, oxygen, nutrition, pH, temperature etc). These factors all combine to make the aquatic environments very complicated. Chemical and biological parameters which tell us something about the nature of the pollutant and the bacteria degrading the polluting oil is thus very important in order to get some handle on understanding the condition of the marine environment and effects of pollution on it.

Many different approaches can be taken to describe the composition of microbial communities in marine environments. **Bacterial numbers** can be measured by traditional methods based on culturing or, more appropriately, by microscopic techniques. Other methods are also applicable. Culture based techniques are not very representative because only a small fraction of the marine bacterial species are easily cultured under standard conditions. Several methods for estimating **microbial activity** are also available. These include measuring respiration rates, levels of cell components, metabolic degradation of specific substrates etc. Many of the methods for measuring cell activity have the common characteristic that they are difficult to use *in situ* and without interfering with the natural processes taking place. **Microbial diversity** (genetic) can also be estimated in different ways. Many methods are based on interpreting information present in the DNA and RNA molecules of the cells. The

complexity of analysis and the level of usefulness of the resulting information varies. Many of the RNA/DNA based methods involve extraction of DNA/RNA directly from an environmental sample or after cell enrichment (cultures), direct cloning, or amplification followed by cloning, of the extracted RNA/DNA's, and then sequencing and comparative analyses of the clones. Other approaches to diversity estimations can also be applied, e.g. analyses of the lipid composition (RFLP) of microbial cells.

An understanding of the composition of crude oil is summarised in order to understand and follow the progress of biodegradation. The compositional differences of different crude oil types are illustrated. Microbes remove the components of oil that are easiest to metabolise. The chemical techniques and components are introduced which are used to obtain chemical information about the identity and degree of biodegradation of crude oil spills. Components showing promise of useful information are organic acids. Work suggesting that the type of acid produced by bacteria could provide information on the metabolic pathway (aerobic or anaerobic) is referenced. Other such components could provide an indication regarding the temperature and time at which degradation took place. Recent work is also discussed which suggests that iron reducing bacteria play an important role during biodegradation of hydrocarbons under natural conditions. This mineral environment and oil compositional parameter also needs to be looked at when considering effects on the biological community due to oil spills.

The purpose of establishing a method for evaluation of the contamination of marine habitats based on the microbial composition is twofold: The method must provide a rapid and precise indication of the contamination status of the environment. Secondly, it must be simple and suitable for use as a screening test. It is hoped that the method will be able to replace other more complex methods for mapping of contamination or at least reduce the dependance on a very large number and type of analyses. Combining such a method with a minimum of other relevant analyses in connection with an oil spill will provide a better system for surveillance of the environment during incidents of acute or chronic releases. Examination of the microbial compositional changes in the environment will hopefully also provide information about the state of recovery of the contaminated location.

1 Bakgrunn

Bakgrunnen for at dette prosjektet ble initiert er at det ble opprettet en arbeidsgruppe som fikk ansvar for oppfølging av stortingsmelding nr. 26 (1993-1994): *'Om utfordringer og perspektiver for petroleumsvirksomheten plassert i et samfunnsøkonomisk og miljø perspektiv'*. Det ble satt spesielt fokus på den del som omhandler *'biologisk overvåkning, innsamling og bearbeidelse av data om havmiljøets tilstand, og tilsvarende om langtidsvirkninger av olje og kjemikalier samt oljevernberedskap'*. Arbeidsgruppen påpekte at langtidseffektene på det marine miljø av petroleumsvirksomhetens utslipp av olje og kjemikalier ikke er godt nok kjent, og på bakgrunn av dette ble det tatt initiativ til å presentere prosjektidéer som belyser disse problemstillingene.

I RF's prosjektskisser innen området mikrobiell nedbrytning av olje ble det opprinnelig presentert tre prosjektidéer som gikk på; 1) Nedbrytning av olje ved mikrobielle prosesser i frie vannmasser etter akutte utslipp, 2) Mikrobiell genetisk "fingerprint" som indikator på forurensingstilstand i vannmassene, og 3) Mikrobiell nedbrytning av olje innblandet i sediment på havbunnen.

Det igangsatte prosjektet er et litteraturstudium for å kartlegge og identifisere egnede metoder for kjemiske og mikrobielle analyser i forbindelse med mikrobiell nedbrytning av olje. Vi har valgt å sette fokus på *hvordan mikroorganismer kan brukes som indikatorer på forurensing* ("genetisk fingerprint"). Kjemiske egenskaper av olje og metoder for å se på biodegradering vil også bli berørt.

Målsetningen med prosjektet er å - på bakgrunn av den informasjonen som kommer frem i litteraturstudiet - vurdere om en metode basert på å se på endringer i/egenskaper til det mikrobielle samfunnet vil være en realistisk tilnærming for å kunne si noe om påvirkning/forurensing i et miljø.

Rapporten vil ende opp med en anbefaling om hvordan potensialet for å bruke den mikrobielle statusen til miljøet eventuelt kan undersøkes nærmere. Vi vil se på om det er mulig å knytte denne problemstillingen opp mot spesifikke prosjekter/områder der den skisserte innfallsvinkelen kan være aktuell (kaldt vann/dypt vann).

2 Innledning

Problemstillingen i prosjektet er som følger: Kan den mikrobielle sammensetningen og/eller mikrobielle prosesser som dominerer i miljøet brukes som en indikator på (olje)forurensing i marint miljø?

For å kunne si noe om dette er det viktig å kartlegge hvilken rolle mikroorganismer har i det marine miljøet generelt, hvilke mikroorganismer som dominerer ved forskjellige betingelser, og hvilke mikroorganismer som er i stand til å bryte ned hydrokarboner under ulike forhold.

Et viktig aspekt i prosjektet har vært å se på metoder som kan brukes til å se på den mikrobielle strukturen til miljøet. Dette er et stort område, som er i stadig utvikling. De metodiske tilnærmingene som er presentert her representerer et utvalg av det arbeidet som er gjort og gjøres innenfor området. Vi har også valgt å ta med informasjon om olje, hvordan den oppfører seg i miljøet, hvordan den brytes ned, og metoder som kan brukes for å undersøke slike parametre. Slike metoder vil være et viktig supplement for å kunne vurdere sammenhengen mellom endret genetisk diversitet og forurensing.

Vi har prøvd å summere opp det vi har funnet og på bakgrunn av det trukket konklusjoner om hvorvidt en tilnærming basert på mikrobiell struktur kan benyttes som en indikator på forurensing. Til slutt har vi presentert en projektskisse over hvordan dette kan føres videre med det formål å nå frem til en tilfredsstillende metode.

2.1 Mikroorganismer i miljøet

2.1.1 Sammensetning og diversitet av mikroorganismer i marint miljø

Alt liv på jorden har tradisjonelt blitt delt opp i to hovedgrupper; (kongedømmer) Eukaryote (planter og dyr) og Prokaryote (bakterier). Ettersom stadig bedre metoder for å identifisere, karakterisere og sammenligne organismer har blitt tilgjengelig, har den tradisjonelle inndelingen måtte vike plassen for stadig nye endringer. I løpet av de siste årtier har økt kunnskap revolusjonert den tradisjonelle fylogien. I dag blir alt liv klassifisert i tre domener; *Bacteria*, *Archaea* og *Eucarya* (Hugenholtz *et al.*, 1998). Mikroorganismer som tradisjonelt har blitt kalt bakterier faller inn under de to gruppene *Bacteria* og *Archaea*. Grunnen til at mikroorganismer som opprinnelig ble klassifisert som Prokaryote nå er delt i de to domenene *Archaea* og *Bacteria* er at basert på sammenligning av genetiske trekk er det store forskjeller mellom disse to gruppene, like store som avstanden til eukaryote organismer.

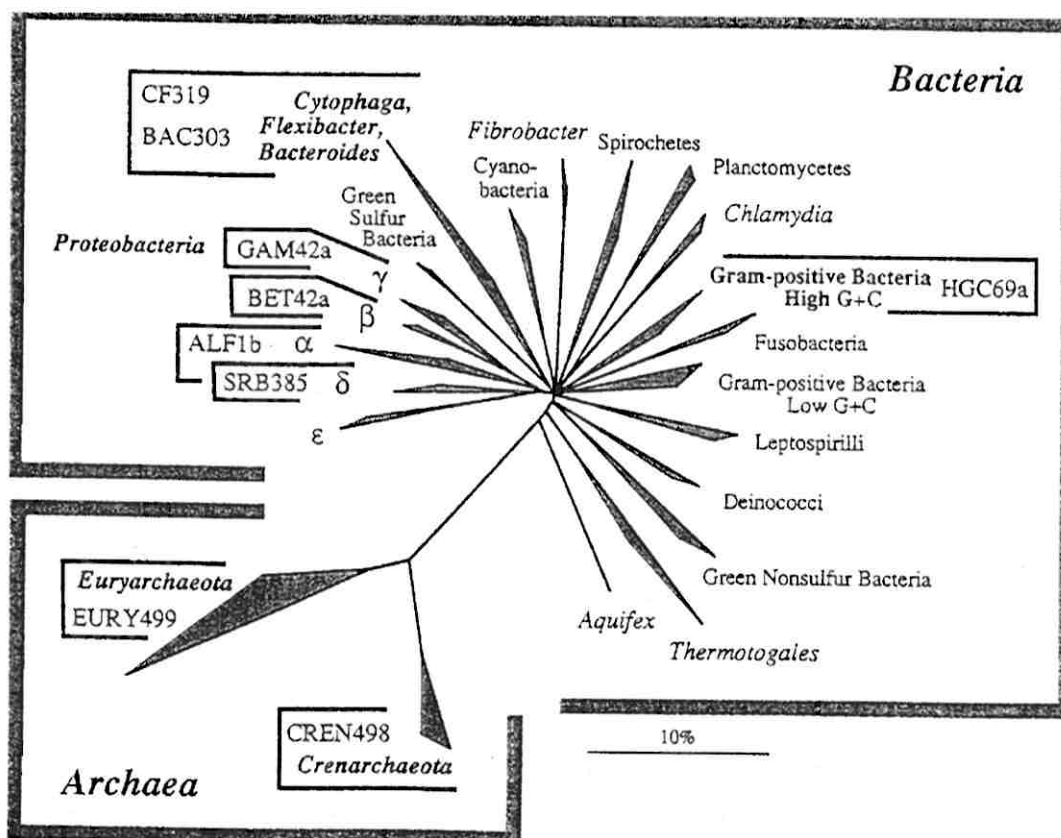
Marine planktoniske økosystemer er dominert av bakterier og andre mikroorganismer. Disse mikroorganismene utgjør en viktig kilde av primære produsenter og heterotrofe konsumenter i de fleste marine systemer (Fuhrman *et al.*, 1993). Globalt sett er mikroorganismer de dominerende organismene både ved at de viser størst diversitet og ved total biomasse i følge Torsvik *et al.* (1996). Sammensetningen av det mikrobielle samfunnet i sjøvann og marint sediment er ikke godt karakterisert (Llobet-Brossa *et al.*, 1998), men noen fellestrekk er klare; mikroorganismer som hører til domenet *Bacteria* dominerer, og mange av disse hører inn under gruppen *Proteobacteria* (Gonzales & Moran, 1997; Gray & Herwig, 1996; Sahn & Berninger, 1998; Suzuki *et al.*, 1997). Virus finnes også i et betydelig antall i marine sedimenter (Drake *et al.*, 1998; Weinbauer & Suttle, 1997).

Diversiteten til marin bakterioplankton har i mange tilfeller blitt studert ved kloning og sekvensiering av rRNA gener (rDNA) (Suzuki *et al.*, 1997). (Se kapittel 2.1.3. for nærmere beskrivelse av ulike mikrobielle analysemetoder). En vanlig observasjon har vært at gener som sekvensieres direkte fra en marin miljøprøve ikke samsvarer med gensekvenser som finnes i dyrkede marine organismer (Suzuki *et al.*, 1997). Dette blir ofte tolket som en indikasjon på at de marine mikroorganismene som finnes i store

mengder i miljøet er vanskelig å dyrke ved vanlige metoder. Dette samsvarer med den generelle oppfatningen at bare en liten fraksjon av de tilstedeværende mikroorganismene er dyrkbare (Fry & Zia, 1982; Fuhrman *et al.*, 1993; Leff *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997). En annen alternativ forklaring er at marine bakterier er dyrkbare, men at de er dårlig representert i sekvensdatabaser, og dermed ikke blir beskrevet (Suzuki *et al.* 1997). Pinhassi *et al.* (1997) hevder at de dominerende marine bakterioplankton-artene finnes blant de dyrkbare bakteriene i prøver fra marine kystområder. Det er ikke klart hvor stor andel de dyrkbare mikroorganismene utgjør av den totale mikrobielle populasjonen. Det er imidlertid enighet om at det er manglende forståelse av mange mikrobielle prosesser, organismer involvert, og viktigheten av ulike prosesser i ulike miljøer.

Gonzales & Moran (1997) undersøkte den mikrobielle sammensetningen i sjøvann hentet fra kysten av USA ved hjelp av 16S rDNA analyser. De fant at marine bakterier som hører inn under α -3 subklassen av *Proteobacteria* utgjorde inntil 28% av 16SrDNA sekvensene i sjøvannsprøven. Gonzales & Moran (1997) fant at en stor del av disse bakteriene lot seg dyrke på sjøvanns-agarplater med lav konsentrasjon av næring. Suzuki *et al.* (1997) fant at γ - og α -*Proteobacteria* utgjør en stor andel av mikroorganismer fra marine miljøprøver, både ved dyrking og direkte ved gen-kloning. Andre viktige grupper er *Flavobacter/Cytophaga*- gruppen (hovedsakelig ved dyrkede bakterier), β -*Proteobacteria* og Gram positive bakterier. I sedimentprøver fra tyske Wadden Sea ble det funnet en dominans av *Flavobacter/Cytophaga*- gruppen blant den indentifiserbare fraksjonen (rRNA-oligonukleotider og DAPI farging) (Llobet-Brossa *et al.*, 1998). Andre viktige grupper inkluderte undergrupper av Proteobakterier (ϵ og δ subgruppene). I dette arbeidet ble det ikke påvist *Archaea* i signifikante mengder (Llobet-Brossa *et al.*, 1998). Gener identifisert ved kloningsteknikker og fra bakterier isolert fra kulturer med utgangspunkt i den samme sjøvannsprøven var forskjellige (Suzuki *et al.*, 1997). Undersøkelser av marine sedimenter i arktiske strøk viste også at det var en dominans av *Bacteria* over *Archaea* (Sahm & Berninger, 1998). Det er også gjennomført molekylære analyser av mikroorganismer fra sediment tatt fra verdens dypest havområde (Mariana Trench - 11000 m). Fra analyser av PCR amplifisert 16S rRNA ble det funnet gener som representerer både planktoniske marine *Archaea*, barofile bakterier, og bakterier som er nært beslektet med *Pseudomonas* (Kato *et al.*, 1997). Murray *et al.* (1998) har også rapportert om betydelige mengder av *Archaea* (5-14% av DAPI-fargede celler, og 1-17% av total rRNA) i Antarktiske kyst-strøk. Figur 1 viser et eksempel på et fylogenetisk tre basert på 16S rRNA identifikasjon.

Med tanke på hvor stor del marine miljøer utgjør av jordkloden er det realistisk å anta at den mikrobielle diversiteten i marine miljøer er høy. Tradisjonelle metoder har ikke gitt et tilfredsstillende bilde av den mikrobielle diversiteten i marine miljøer, og det er først nå når nye alternative metoder begynner å gjøre seg gjeldende at vi begynner å danne oss et inntrykk av kompleksiteten og diversiteten til det marine, mikrobielle samfunnet.



Figur 1. Eksempel på fylogenetisk tre basert på 16S rRNA analyser vha. oligonukleotid prober (fra Amman *et al.*, 1995).

Figure 1. Example of phylogenetic tree based on 16S rRNA analysis by oligonucleotide probes (from Amman *et al.*, 1995).

2.1.1.1 Mikroorganismer som bryter ned hydrokarboner

En rekke mikroorganismer er i stand til å bryte ned olje (hydrokarboner). Mikroorganismer som kan degradere hydrokarboner (HDM) finnes i de fleste miljøer (Prince, 1993), og nedbrytningsprosessene finner sted både under aerobe og anaerobe forhold, som rapportert blant annet av Atlas (1985), Bregnard *et al.* (1997) og Prince (1993). HDM finnes i kalde, marine økosystemer så vel som i tempererte områder (Atlas, 1985). Det er en vanlig observasjon at konsentrasjonen av HDM øker som en respons på at hydrokarboner tilføres miljøet (Atlas, 1985; Higashihara & Sato, 1985; Rosenberg, 1992).

Den taksonomiske diversiteten blant HDM er stor (Prince, 1993). Noen viktige taksonomiske grupper av HDM i marine miljøer inkluderer; *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Corynebacterium* m.fl. (Atlas, 1981; Atlas, 1985; Higashihara & Sato, 1985; Prince, 1993; Rosenberg, 1992; Gottschalk, 1986). Dette er de samme gruppene av mikroorganismer som utgjør en viktig del av den mikrobielle populasjonen i marint miljø også ellers, dvs. når det ikke tas hensyn til mikroorganismenes evne til å degradere hydrokarboner. Det er stor variasjon i hvilken type hydrokarboner som brytes ned av ulike mikroorganismer, og hvilke nedbrytningsmekanismer som er gjeldende, både ved aerobe og anaerobe prosesser.

Aerobe nedbrytningsprosesser av hydrokarboner er de dominerende i marine miljøer, men anaerobe prosesser forekommer også; bl.a bryter enkelte *Pseudomonas* arter ned ulike hydrokarboner ved denitrifisering (Bonin *et al.*, 1994; Gilewicz *et al.*, 1991; Hutchins *et al.*, 1991). Anaerobe nedbrytningsprosesser av hydrokarboner forekommer også ved sulfatreduserende, jernreduserende og metanogene vekstbetingelser (Coates *et al.*, 1997), men disse prosessene er ofte langsomme.

2.1.2 Betydningen av mikroorganismer i marint miljø

Økologien til mikroorganismer i akvatiske miljøer er komplisert. Det er mange interaksjoner mellom mikroorganismer, virus, alger, heterotrofe flagellater og ciliater og høyerestående planter og dyr. Det er også en rekke biotiske og abiotiske faktorer som påvirker den mikrobielle populasjonen i et system, som f. eks. tilgang på næringsstoffer og oksygen, predasjon, lys, temperatur, pH, salinitet, tilstedeværelse av partikulært materiale etc. I tillegg til de mange prosesser som er med å regulere den mikrobielle populasjonen i miljøet er mangelfulle metoder for å måle f. eks. mikrobiell aktivitet eller biomasse direkte, uten å påvirke økosystemet, en begrensende faktor når det gjelder å forstå slike økosystemer.

Det er generelt akseptert at i de fleste miljøer er det bare en liten fraksjon (mindre enn 1%) av de tilstedeværende mikroorganismene som er dyrkbare ved kjente metoder (Fry & Zia 1982; Fuhrman *et al.*, 1993; Leff *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997). Det er også vanskelig å finne gode metoder for å måle biomasse eller vekstrater på en korrekt måte i en rekke miljøprøver (Hobbie & Ford, 1993), selv om nye, forbedrede metoder stadig tæs i bruk. Kvantifisering av celletall og biomasse er viktige for vår forståelse av den økologiske betydningen til mikroorganismer i miljøet (Kepner & Pratt, 1994). Naturlige variasjoner i celledørrelse, innhold av cellekomponenter, metabolsk aktivitet etc., i tillegg til at det kan være vanskelig å måle disse parametrene, gjør at det kan være vanskelig å sammenligne ulike miljøprøver.

Noen estimater av celletall i marine miljøer eksisterer. Turley *et al.* (1996) målte celletall i de øvre 100 meter av Middelhavet som varierte mellom 2 og 8×10^8 celler/ml, mens biomassen varierte fra 4-16 µg C/l. Tilsvarende tall i dypere vannlag var 0.8×10^8 celler/ml, og 1-2 µg C/l. Celletall i sediment fra Svalbard (arktisk) og nær Tromsø ble bestemt ved DAPI-farging til å være i størrelsesorden 2×10^8 - 4×10^9 celler/cm³ vått sediment (Sahm & Berninger, 1998). Både celletallet og aktiviteten avtok nedover i sedimentet. Llobet-Brossa *et al.* (1998) målte celletall i marint sediment og sand fra den tyske Wadden Sea som grenser til Nordsjøen. Celletall i størrelsesorden 4.3 til 4.5×10^9 celler/cm³ ble målt i øvre lag ved DAPI-farging i fint sediment (mudder), mens celletallet var lavere i de øvre 2 centimeter av et tilsvarende sand-lag (6 til 8×10^8 celler/cm³). I følge Llobet-Brossa *et al.* (1998) samsvarer dette med tidligere rapporter fra lignende miljøer. Fra en undersøkelse av bakterietall og virus-lignende partikler (VLP) i vannsøylen og sediment i Chesapeake Bay, USA, ble det målt bakterietall på hhv. 6.5×10^6 og 2.4×10^6 celler/ml i sediment (porevann) og vannsøyle. Tilsvarende tall for VLP var hhv. 3.6×10^8 og 3.8×10^7 VLP/ml i de samme lokalitetene (Drake *et al.*, 1998). Noen studier av mikrobiell aktivitet og fordeling er utført i dypt-vannsmiljøer: Tholosan & Bianchi (1998) så på tetthet av bakterier og respirasjonsrater i vannsonen nær bunnen og i sedimentet på 585 og 2065 meters dyp. De fant at

bakterietetthet og aktivitet var høyere i sedimentet enn i vannsøylen. Informasjon om celtall i marine miljøer er samlet i tabell 1.

Tabell 1. Rapporterte celtall fra marine lokaliteter.

Table 1. Reported cell numbers from various marine locations.

Lokalitet	celler/ml	Metode benyttet	Referanse
Middelhavet (øvre 100m)	2 - 8 x 10 ⁸	DAPI	(Turley, <i>et al.</i> , 1996)
Middelhavet (> 100m)	0.8 x 10 ⁸	DAPI	(Turley, <i>et al.</i> , 1996)
Svalbard, sediment	2 - 40 x 10 ⁸	DAPI	(Sahm & Berninger, 1998)
Wadden Sea, marint, fint sed.	4.3 - 4.5 x 10 ⁹	DAPI	(Llobet-Brossa <i>et al.</i> , 1998)
Wadden Sea, marin sand (2cm)	6 - 8 x 10 ⁸	DAPI	(Llobet-Brossa <i>et al.</i> , 1998)
Chesapeake Bay, USA,	6.5 x 10 ⁶	ikke spesifisert	(Drake <i>et al.</i> , 1998)
Chesapeake Bay, USA,	2.4 x 10 ⁶	ikke spesifisert	(Drake <i>et al.</i> , 1998)

Gjennomsnittlig innhold av karbon og nitrogen i bakteriepopulasjoner i åpent hav ble målt til henholdsvis 12,4 ± 6,3 og 2,1 ± 1,1 fg/celle (Fukuda *et al.*, 1998). Tilsvarende tall for bakterier fra kystnære områder var; 30,2 ± 12,3 og 5,8 ± 1,5 fg/celle (Fukuda *et al.*, 1998). Forholdet mellom C og N i cellene var ikke signifikant forskjellig i hav- og kystpopulasjonene (hhv. 6,8 og 5,9).

Det er ofte vanskelig å måle mikrobiell aktivitet i marine vann- og sedimentprøver. Spesielt kan det være vanskelig å relatere aktiviteten til celtall, fordi en stor andel av mikrobielt DNA ikke er assosiert med levende, aktive celler (Dell'Anno *et al.*, 1998). Metoder som kan være aktuelle for å bestemme biomasse i miljøprøver inkluderer bl.a. bestemmelse av biovolum ved mikroskopiske teknikker (Blackburn *et al.*, 1998; Bratbak, 1993; Loferer-Krössbacher *et al.*, 1998; Verity & Sieracki, 1993), bestemmelse av biomasse basert på analyse av lipidsammensetning (kan også brukes til å estimere mikrobiell vekst i den samme prøven) (Dobbs & Findlay, 1993), estimering av biomasse basert på målinger av partikulært ATP (Karl, 1993) og bestemmelse av biovolum, bakterietetthet og vekst basert på bildeanalyser (Blackburn *et al.*, 1998).

2.1.3 Metoder for å se på den mikrobielle strukturen til miljøet

Dette avsnittet er delt inn basert på hvilken type informasjon ulike metodiske tilnærminger gir om mengde og fysiologiske typer av mikroorganismer, mikrobiell aktivitet eller fylogenetisk sammensetning av de tilstedeværende mikroorganismene. En del av metodene vil kunne gi informasjon på flere nivåer. Tradisjonelle metoder for å se på antall mikroorganismer er fortsatt under utvikling, og gir etterhvert et mer differensiert bilde også av diversitet og kompleksitet i en prøve. En annen aktuell tilnærming for å vurdere betydningen av mikroorganismer i miljøet er å se på mikrobiell aktivitet.

Metoder for å bestemme genetisk diversitet er i stadig utvikling, og innføring av metoder basert på molekylære teknikker og spesielt nukleinsyre-analyser har vært svært viktig. Slike metoder har i mye større grad gjort det mulig å analysere den informasjonen som finnes i DNA. Analyser av DNA kan gjennomføres med ulike

presisjonsnivå, der sekvensiering av DNA og RNA gir størst presisjon, mens f. eks. PCR-baserte fingerprinting teknikker gir lavere presisjon (Torsvik *et al.*, 1996).

2.1.3.1 Metoder for å bestemme tilstedeværelse og antall av mikroorganismer

Celletall-estimerer varierer ved bruk av ulike metoder. Vanlige metoder inkluderer;

1) Tradisjonelle metoder basert på dyrkning av mikroorganismer (f.eks. Colony Forming Units (CFU) og Most Probable Number (MPN) metoder). Ved disse metodene blir celletall-estimatene basert på den del av de levende mikroorganismene som er dyrkbare ved de valgte betingelser. Slike metoder kan benyttes både til å se på generell vekst av mikroorganismer, og til å se på grupper av mikroorganismer som er i stand til å vokse ved spesifikke vekstbetingelser (fysiologiske egenskaper av mikroorganismene).

2) Ulike mikroskopi-teknikker. De vanligste inkluderer lys- og fluorescensmikroskopi og scanning elektronmikroskopi, teknikker som kan brukes på mange forskjellige måter. I tillegg finnes også ulike "nye" mikroskop-teknikker som er aktuelle; f. eks. blir Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) benyttet til å se på levende mikroorganismer i marine biofilmer (Norton *et al.*, 1998).

Gode estimater av celletall, biomasse og mikrobiell aktivitet er viktige parametre bl.a. når man skal se på endringer i økosystem som et resultat av forurensning. Bruk av fluorescerende fargestoffer er en mye brukt teknikk, som kan benyttes både ved bestemmelse av totale bakterietall, fraksjoner av spesifikke organismetyper, og for å se på mikrobiell aktivitet (Bloem, 1995). Det finnes en rekke fargemetoder som gjør det mulig å skille mellom mikroorganismer og andre komponenter, mellom aktive og inaktive mikroorganismer, og i noen tilfeller også mellom ulike grupper av mikroorganismer ved mikroskopi. Vanlige teknikker er fluorokrom-baserte metoder; -farging av mikroorganismer med DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) eller AO (Acridin Orange) fluorescente fargestoffer- der fargestoffet binder til DNA (DAPI) eller både DNA og RNA (AO) i cellene (Kepner & Pratt, 1994). I slike fluorokrom-baserte metoder farges både døde, inaktive og aktive celler i prøven (Kepner & Pratt, 1994). Dobbelfarging med f.eks. Europium chelat og FB gjør det mulig å skille mellom aktive og inaktive celler ved at aktive celler farges røde av Europium chelat, mens inaktive eller døde celler farges blå av FB.

Andre nukleinsyre-fargestoffer er også aktuelle; SYBR Green I blir bl.a. benyttet til å telle virus og bakterier i marine prøver (Noble & Fuhrman, 1998), og SYBR Green II og andre grønne fluorescente nukleinsyre-fargestoffer er også funnet å være effektive for å telle og for å estimere størrelse, form og biomasse av sediment- og jordbakterier (Weinbauer & Suttle, 1998). Fluorokrom-baserte fargemetoder kan også kombineres med gruppe-spesifikke oligonukleotid-prober (Amman *et al.*, 1995; Llobet-Brossa *et al.*, 1998). Det er da mulig å kvantitativt skille mellom ulike grupper av mikroorganismer i en prøve.

Immunofluorescens metoder kan også benyttes til identifikasjon og telling av mikroorganismer i en miljøprøve. Ved å bruke antigen/antistoff bindinger kan man identifisere arter/grupper av mikroorganismer som ved RNA/DNA-identifiserings-

teknikker (Campbell, 1993; DeLong, 1993). Ved identifikasjon av spesifikke arter eller grupper av mikroorganismer krever imidlertid metoden at man har klart å isolere og dyrke opp aktuelle mikroorganismer for å designe spesifikke prøber (Campbell, 1993).

Direkte telling av celler erstatter nå i stor grad tradisjonelle dyrkningsmetoder, da celletallet blir signifikant underestimert ved slike metoder (Kepner & Pratt, 1994). For eksempel målte Suzuki *et al.* (1997) celletallet ved DAPI til å være mye høyere enn celletallet ved måling av CFU (Colony Forming Units). Også Amman *et al.* (1995) refererer til en rekke studier som viser at direkte telling av bakterier i mikroskop gir mye høyere celletall enn tilsvarende CFU verdier for den samme prøven. For sjøvannsprøver er dyrkbarheten rapportert til å være fra 0,001-0,1 % (Amman *et al.*, 1995).

Metoder for å bestemme mikroorganismer i frie vannmasser og i sediment er i prinsippet de samme, men tilpasninger av metodene kan være nødvendig for å unngå at partikler, organisk materiale etc. i prøvene påvirker resultatet.

2.1.3.2 Metoder for å bestemme mikrobiell aktivitet

Det finnes en rekke ulike metoder som kan brukes som et mål for mikrobiell aktivitet. Disse inkluderer omsetning av ulike substrater (måles ved spektrofotometriske metoder, kjemiske analyser etc.), måling av respirasjon (oksygen-forbruk, CO₂-produksjon, andre metoder), nivå av cellekomponenter (f.eks. rRNA som har en kort omsetningstid i cellene), inkorporering av radioaktivt merkede forbindelser i arvemateriale mm. Felles for mange av disse metodene er at de kan være vanskelig å benytte *in situ*, og uten at de mikrobielle prosessene som foregår blir påvirket.

Mens metoder basert på DNA ekstraksjon gir informasjon om genetisk sammensetning av mikrobielle samfunn, kan RNA ekstraksjonsmetoder også brukes for å bestemme mikrobiell aktivitet i samfunnet (Pichard & Paul, 1996). Konsentrasjonen av rRNA i cellen kan gi en indikasjon på veksthastighet, og dermed også aktivitet, hos mikroorganismer (Sahm & Berninger, 1998). Ekstraksjon og bestemmelse av det totale RNA innholdet gir et mål for den totale mikrobielle aktiviteten, mens teknikker som måler uttrykkelsen av spesielle mål-gener vil kunne gi informasjon om spesifikke prosesser i prøven. Celler inneholder tre typer av RNA; mRNA (messenger RNA) er lite stabilt, rRNA (ribosomalt RNA) og tRNA (transfer RNA) er relativt stabile RNA molekyler som gir informasjon om vekstrater og diversitet av spesifikke organismer, mikrobielle populasjoner eller hele samfunn (Pichard & Paul, 1996).

Bruk av teknikker som f. eks. høy resolusjon Flow Cytometri og multiparameteranalyser gjør det mulig å måle både størrelse på celler, innhold av DNA og innhold av RNA i tillegg til den totale mikrobielle populasjonen (celleantall). Flow cytometriske teknikker måler direkte på levende celler. Slike målinger kan bl.a benyttes til å estimere den mikrobielle aktiviteten i cellene (Button & Robertson, 1993).

CTC er et fluorogent fargestoff som kan benyttes til å måle celle-spesifikk metabolsk aktivitet. Forbindelsen virker som en elektronakseptor i elektrontransportkjeden til bakterier (Smith, 1998). Oksidert CTC er nesten fargeløst, men når dette reduseres via mikroorganismenes elektrontransportkjede dannes fluorescent, uløselig CTC-formazan

som akkumuleres intracellulært (Rodriguez *et al.*, 1992). CTC gir et økologisk betydningsfullt mål på mengden av aktive celler i et akvatisk system, i motsetning til metoder som måler totaltall av bakterier (Smith, 1998).

Metabolsk aktive celler kan også måles ved bruk av FDA (fluorescein diacetate) (Bloem, 1995). Cellulære enzymer (lipaser, proteaser og esteraser) hydrolyserer fargeløst FDA til fluorescein som er gult. Produktet kan bl.a måles kvantitativt ved hjelp av spektrofotometer, eller ved fluorescens mikroskopi, og metoder tilpasset bruk for sjøvann og marine sedimenter forurenset av olje er tilgjengelige (Kjeilen *et al.*, 1996; Schnürer & Rosswall, 1982). Ved å anta at den enzymatiske aktiviteten er proporsjonal med nedbrytningen, kan metoden benyttes som et relativt mål på ikke-spesifikk nedbrytning av karbon-forbindelser i en prøve (Schnürer & Rosswall, 1982).

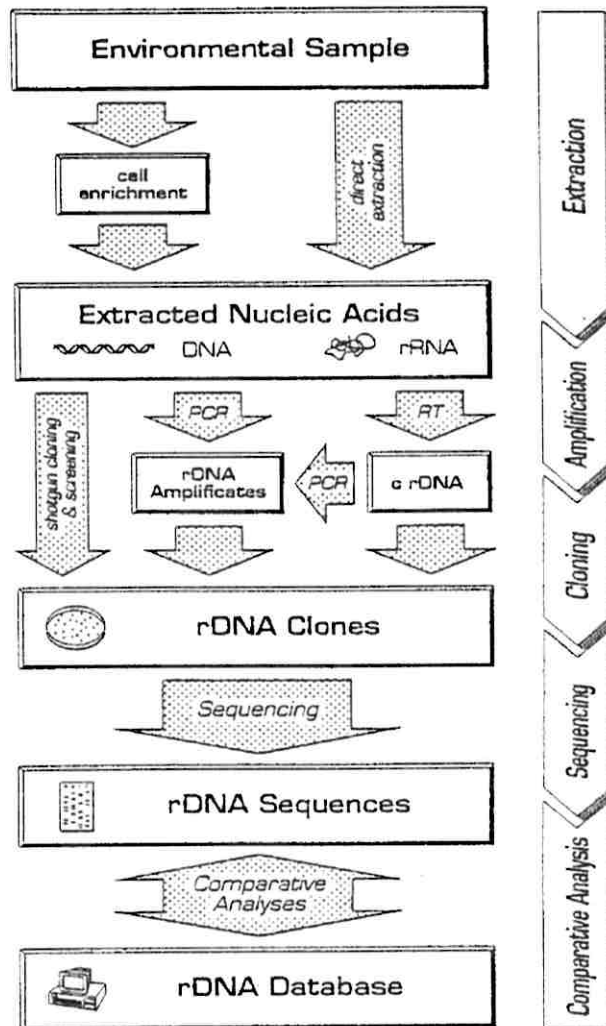
Fabiano & Danovaro (1998) har sett på ekstracellulær enzym aktivitet (EEA) i sediment tatt fra ca. 500 meters dyp i Antarktisk. EEA regnes for å være en hovedprosess i nedbrytning og mikrobiell nyttiggjørelse av organiske polymerer siden forbindelsene er for store til å kunne tas opp i cellene (Fabiano & Danovaro, 1998; Gottschalk, 1986). Ekstracellulær enzymatisk aktivitet kan bl.a. måles ved å se på aktiviteten til enzymene β -glucosidase og aminopeptidase.

Av andre aktuelle metoder kan nevnes; måle rate for inkorporering av thymidin og leucin i arvestoffet -metoden brukes som mål for mikrobiell produksjon-, måle frekvens av celledeling (frequency of dividing cells - FDC) ved å telle celler i deling ved transmisjons elektron mikroskopi (TEM) (Tuomi, 1997), omsetning av radioaktivt merkede substrater, som f.eks. ^{14}C glutamate respirasjon, (Tholosan & Bianchi, 1998), eller omsetning av PAH forbindelser som f. eks. phenanthrene, hexadecane som har blitt brukt i mange sammenhenger.

2.1.3.3 Metoder for å se på genetisk mikrobiell diversitet

Det finnes en rekke molekylære teknikker som kan benyttes for å bestemme diversiteten av komplekse mikrobielle samfunn (Amman *et al.*, 1995). Nye metoder gjør det lettere å identifisere og kvantifisere mikroorganismer i naturlige miljøer (Paul, 1993). Det er imidlertid fortsatt nødvendig å isolere og dyrke opp mikroorganismer ved en rekke av disse metodene (f. eks. immunologiske metoder). Det største potensialet til DNA/RNA hybridiseringsteknikker er å benytte metodene direkte til å detektere mikroorganismer i miljøet ved å ekstrahere DNA og probe uten å dyrke mikroorganismene først (Paul, 1993). Hybridiseringsteknikker er lettest å bruke for å detektere kjente mikroorganismer. Bruk av 16S-rRNA molekyler ved hybridisering har vist seg å være spesielt aktuelt fordi celler inneholder store mengder av disse spesifikke, genetisk identiske molekyler. Dette gjør at sensitiviteten og nøyaktigheten ved metoden øker. Prober for slike rRNA sekvenser kan lages på mange fylogenetiske nivåer, helt ned til arts- og stammenivå (Paul, 1993). Ved å amplifisere (kopiere) sekvenser fra 16S-rRNA molekyler ved PCR, eller ved å konvertere isolerte rRNA sekvenser til komplementært DNA (rcDNA) kan man lage spesifikke vektorer for deteksjon av ulike mikroorganismer, også arter som ikke er dyrkbare (referert av Paul, 1993). Arbeidet med å lage slike prober er svært arbeids- og tidkrevende. Prober er mest egnet for å se på spesifikke arter/grupper i en prøve, ikke til å bestemme diversitet. Bruk av generelle

prober vil hovedsakelig gi informasjon om antall av en større gruppe, f. eks *Bacteria* kontra *Archaea* i en miljøprøve. Figur 2 viser en skisse over ulike muligheter for å karakterisere miljøprøver basert på rRNA sekvensanalyser.



Figur 2. Flyt-diagram som viser ulike muligheter for å karakterisere mikrobielle prøver basert på rRNA-sekvensanalyser (etter Amman, 1995). (RT= revers transcriptase)

Figure 2. Flow chart showing different possibilities to characterize environmental samples by rRNA sequence analysis (from Amman, 1995). (RT= reverse transcriptase)

Jord og sediment er heterogene miljøer som består av både uorganiske og organiske komponenter, foruten en divers sammensetning av mikroorganismer (Torsvik, 1996; Van Elsas & Smalla, 1995). Ekstraksjon og analyse av mikrobielt DNA fra jord/sediment er nyttig på flere måter: - det gir informasjon om utbredelse av spesifikke gener i økosystemet; - ved å se på forholdet mellom forskjellige ribosomale DNA sekvenser f. eks. kan man få informasjon som beskriver populasjonsstrukturen til de mikrobielle miljøene, og; - ved å se på ekstrahert DNA kan man også se på celler som ikke er dyrkbare (Van Elsas & Smalla, 1995). To prinsipielt forskjellige tilnærminger til ekstraksjon av DNA fra jord/sediment finnes: Indirekte metoder der prinsippet er å først

separere cellene fra jorden/sedimentet, og deretter lyse celler og ekstrahere ut DNA effektivt (Torsvik, 1996), og direkte metoder der hele prøven blir homogenisert, celleveggene brutt opp, og DNA blir ekstrahert uten at jord/sediment partiklene blir skilt fra cellene først (Johnston *et al.*, 1996). Det er fordeler og ulemper ved begge tilnærmingene, og gjenvinningsprosenten vil variere med prøvens natur og innhold. Det er ofte større gjenvinning av DNA ved direkte ekstraksjon av DNA kontra indirekte ekstraksjon (Johnston *et al.*, 1996; Van Elsas & Smalla, 1995). Det er vanskelig å ta representative DNA prøver fra miljøprøver, og dette har vært en begrensende faktor for bruk av molekylære teknikker i mikrobiell økologi (Johnston *et al.*, 1996).

Informasjon i DNA fra et komplekst miljø kan analyseres ved ulike teknikker. To teknikker som begge gir et mål for total diversitet er: 1) å måle basesammensetningen av totalt DNA (% G+C), og 2) å måle reassosiering av denaturert (enkeltråd) DNA (Torsvik *et al.*, 1996).

Basesammensetningen av DNA (% G+C) kan bestemmes ved å spektrofotometrisk måle økning i absorbans ettersom dobbeltrådet DNA denatureres, med økende temperatur. Etersom bindingene mellom hhv. A+T basepar har en annen styrke enn tilsvarende bindinger mellom G+C basepar vil dette reflekteres i smeltekurven til DNA-prøven. Basesammensetningen kan også bestemmes ved såkalt 'isopycnic' sentrifugering. Også denne metoden baseres seg på at bindinger til A+T baseparene skiller seg fra bindingene til G+C baseparene i DNA (Torsvik *et al.*, 1996).

Reassosiasjons-målinger kan benyttes både for å se på DNA til en enkelt stamme, en blanding av bakterieisolater eller hele mikrobielle samfunn. Ved komplekse mikrobielle samfunn vil *reassosiasjon diversitets indekser* kunne si noe om hvor mange forskjellige mikrobielle genomer den dominerende delen av DNA stammer fra (Torsvik *et al.*, 1996). Måling av mikrobiell genetisk diversitet ved DNA reassosiasjon krever et svært rent DNA som er fritt for eukaryot DNA og andre forurensinger som kan forstyrre målingene.

Mange av de molekylære teknikkene som kan benyttes for å bestemme diversiteten av komplekse mikrobielle samfunn inkluderer bruk av 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) til å amplifisere mer og mindre konserverte gen-sekvenser. Det er to hovedapplikasjoner for PCR innen akvatisk mikrobiell økologi: 1) deteksjon av spesifikke organismer i et utvalg av naturlige mikroorganismer, eller 2) deteksjon av konserverte gen-sekvenser i et naturlig mikrobielt miljø (Paul, 1993).

Det er mange muligheter for videre identifikasjon og separasjon av slike PCR-fragmenter: Noen eksempler er; 1) screening av rRNA gener ved 'restriction fragment length polymorphism' (RFLP) (Dojka *et al.*, 1998), 2) separasjon av PCR fragmenter basert på både størrelse av fragmentene og ulike base-par sekvenser i PCR-fragmenter med samme lengde ved 'denaturing gradient gel electrophoresis' (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993), eller 3) 'amplified rDNA restriction analysis' (ARDRA) som kan brukes som en rask metode for å se på genotypiske endringer i en lokalitet over tid, eller mellom ulike lokaliteter, som et resultat av ulike miljøforhold.

Screening ved RFLP analyser av PCR amplifisert 16S rDNA fra DNA isolert fra marint sediment har bl.a. blitt benyttet av Herwig *et al.* (1998) som et ledd i å undersøke

mikrobiell diversitet, hvordan forurensing med PAH påvirker sammensetningen, og for å finne indikator-organismer i det marine sedimentet. Utgangspunktet for ARDRA metoden er at restriksjons-setene på RNA operonet er fylogenetisk konserverte. To tilnærminger kan benyttes: genene for enten 16S rRNA eller nukleinsyresekvensen mellom 16S og 23S rRNA amplifiseres ved PCR. Videre behandling inkluderer kutting med restriksjonsenzymmer, og separasjon av gensekvensene. Metoden gir et bilde av struktur og sammensetning av et mikrobielt miljø, og krever ikke at mikroorganismene er dyrkbare. Hovedfordelen med metoden er at den er rask å utføre, og at den gir et bilde av de til enhver tid dominerende fylogenetiske gruppene i et habitat (Massol-Deya *et al.*, 1996).

I likhet med en del av de andre nevnte metodene har også PCR-teknikker sine begrensninger. Det er f. eks nødvendig å ha en del informasjon om gensekvensene for å kunne lage primerer som kan benyttes til amplifisering, noe som begrenser metoden til å benyttes på konserverte gener. Videre er det nødvendig at DNA som benyttes er svært godt rensset. Omfattende renssetrinn vil samtidig redusere sensitiviteten av metoden. I tillegg vil mulighetene for å få amplifisert "falske" gensekvenser være tilstede (Atlas, 1993; Paul, 1993). Det arbeides imidlertid stadig med prosesser for å forbedre aktuelle metoder for ekstraksjon og opprensing av cellulært DNA og RNA (Gray & Herwig, 1996). Slike forbedringer er med å opprettholde sensitiviteten til metoden, og vil også redusere muligheten for å få amplifisert feile gensekvenser ved at DNA/RNA sekvensene blir bedre bevart (Gray & Herwig, 1996).

Det er viktig å være klar over at tilstedeværelsen av en gen-sekvens i miljøet, enten den detekteres ved hjelp av amplifisering eller direkte probe-teknikker bare gir informasjon om potensialet for at en metabolsk aktivitet kan finne sted, eller om en spesiell mål-organisme er tilstede. Den gir ingen informasjon om organismen er levedyktig eller om de enzymene genene koder for faktisk blir uttrykt i prøven (Paul, 1993).

Informasjon som finnes i DNA/RNA molekyler kan også undersøkes ved andre teknikker, bl.a. ved kolonihybridisering. Prinsippet er å lyse bakteriekolonier *in situ*, og hybridisere det denaturerte cellulære DNA til DNA eller RNA prober. Et negativt aspekt ved metoden er at det bare er mulig å se på de dyrkbare mikroorganismene (som i enkelte tilfeller utgjør bare en svært liten del av det totale cellematerialet). Det er også nødvendig å ha en akseptabel og representativ metode for å lyse mikroorganismer. Det er to tilnærminger for bruk av metoden; - den kan brukes til å identifisere en kjent indikatororganisme (spesifikk probe), eller det kan benyttes en mer generell probe for å identifisere og delvis kvantifisere alle mikroorganismer med gitte egenskaper (Hirsch, 1995).

En annen metode for å se på strukturen til mikrobielle samfunn og biomasse baserer seg på analyser av fosfolipid-sammensetningen i organisk materiale ekstrahert fra en miljøprøve (Fang & Barcelona, 1998; Fang *et al.*, 1997; Fang & Findlay, 1996; Langworthy *et al.*, 1998). Ved å se på forskjeller i sammensetningen av fosfolipid-fettsyre-estere (PLFA) ved gasskromatografi/ massespektrometri er det mulig både å estimerer biomasse (ved å anta et konstant fosfolipidinnhold/celle) og å skille mellom ulike grupper av bakterier og andre mikroorganismer fordi enkelte fosfolipid-fettsyre-estere er karakteristiske for spesielle grupper av bakterier (Fang & Barcelona, 1998;

Fang *et al.*, 1997). F. eks er det mulig å anslå hvorvidt aerobe eller anaerobe mikroorganismer dominerer i en miljøprøve (Fang & Barcelona, 1998). De analytiske metodene som er beskrevet gjør det mulig å analysere både PAH og PLFA i de samme prøvene (Fang *et al.*, 1997). PLFA mønsteret kan følgelig brukes direkte til å se på bionedbrytning av PAH-forurensing ut i fra konsentrasjon av mikroorganismer, type mikroorganismer tilstede, og endringer i PAH-forurensingen.

2.2 Olje i marint miljø

2.2.1 Egenskaper til olje

Oljens egenskaper reflekteres av dens komplekse sammensetning og av de prosesser den har gjennomgått når den ble dannet. Dette er forsøkt beskrevet i de følgende avsnitt.

2.2.1.1 Element sammensetning

Tabell 2 gir den typiske **element sammensetning** til råolje som vekt prosent. Hvis sammensetningen skal uttrykkes som relative atom forhold, finner vi at for hver 1000 C atomer er der 1600 - 2200 H atomer og opp til 25 S atomer, 40 O atomer og 15 N atomer.

Tabell 2. Element sammensetning til råolje (fra Levorsen, 1967).

Table 2. Element composition of crude oil (from Levorsen, 1967).

Element	Vekt prosent
C	82.2 - 87.1
H	11,8 - 14,7
S	0,1 - 5,5
O	0,1 - 4,5
N	0,1 - 1,5
andre	< 0,1

2.2.1.2 Molekylære forbindelser i olje

Flere hundre organiske forbindelser (> 600) er blitt identifisert i råolje. De molekylære forbindelsene som forekommer i de høyeste konsentrasjonene er vist i Tabell 3. Prosent verdiene som er oppgitt er et eksempel fra en detaljert analyse av Ponca City råolje.

Tabell 3. Illustrasjon av det relative forhold av molekylære forbindelser i råolje (Hunt, 1996).

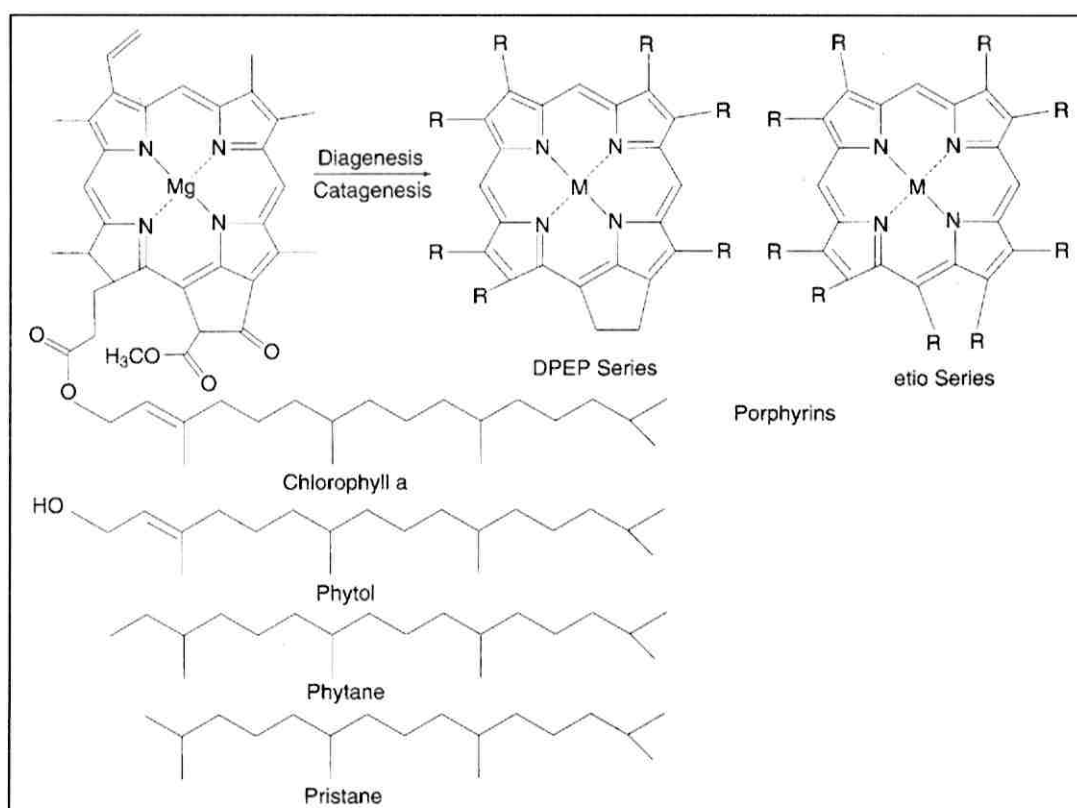
Table 3. Illustration of the relative composition of molecular compounds in crude oil (Hunt, 1996).

Molekylær gruppe	Innhold
Parafiner	25 %
Naftener	50 %
Aromater	17 %
NSO og Asfalter (Polare høy-molekulære forbindelser)	8 %

2.2.1.3 Biomarkører

Det er kun relativt små mengder (< 0.1 vekt prosent) av de forbindelsene som er listet i tabell 3 som er stabile nok til å overleve forholdene og forandringene som skjer gjennom geologisk tid. Disse molekylene beholder en struktur eller et skjelett som gjenspeiler det opprinnelige organiske utgangsstoffet som oljen ble dannet fra. Forbindelser som er stabile over lang tid og som følgelig fungerer som et referansepunkt, kan brukes som en biomarkør. Et eksempel er vist i figur 3. Klorofyll i bakterier, alger eller planter blir omdannet til *porfyrin*, *pristan* eller *phytan*.

Pristan og *phytan* er vanligvis de biomarkørene som finnes i høyest konsentrasjon i den molekylære kategorien 'parafiner' (se tabell 3). Biomarkører som kan plasseres i kategorien 'naftener' er *steraner* og *hopaner*.



Figur 3. Eksempel som viser hvordan en biomarkør (porfyrin og pristan) beholder en gjenkjennbar struktur fra det opprinnelige organiske molekylet (klorofyll a) som eksisterte før dannelsen av råoljen.
Figure 3. Example showing how a biomarker (porphyrin and pristan) keeps a recognisable structure from the original organic molecule (clorophyll a) which existed prior to the formation of the crude oil.

2.2.1.4 Metaller

Spormengder av metaller forekommer i råolje i form av organisk bundne komplekser. Fra figur 3 kan man se at Mg i klorofyll byttes ut med et metall, "M", i porfyrin strukturen til høyre i figur 3. Vanadium og nikkell er de metaller som forekommer ved de høyeste konsentrasjonene i råolje. Konsentrasjonen av metaller øker med økende grad av biodegradering. Metallforhold som V/(V+Ni) affekteres ikke av biodegradering

og kan, fordi forholdstallet er unikt for hver enkelt olje, brukes som en fingerprint til å identifisere oljen. Det har vist seg at innholdet av Fe blir høyere enn V og Ni i biodegraderte oljer (Olsen, 1998). Dette tilskrives bakterier som bruker Fe_{III} fra mineraler som en energikilde (Nealsen & Myers, 1992). Forholdet mellom jern og V + Ni kan brukes som et mål for biodegradering av olje.

2.2.1.5 Kategorier av olje

Den kjemiske sammensetningen av råolje kan brukes til å dele oljene inn i tre hovedkategorier:

- Parafiniske oljer (for eksempel oljer fra Kina)

Disse oljene inneholder hovedsakelig asykliske alkaner og har et svovelinnhold på < 1 prosent.

- Parafinisk - Nafteniske oljer (for eksempel Nordsjø-oljer)

Dette er oljer som hovedsakelig inneholder asykliske alkaner og sykloalkaner. Disse har også et lavt svovelinnhold (< 1 %).

- Aromatisk - Intermediære oljer (for eksempel oljer fra Midt Østen)

Disse oljene inneholder mer enn 50 prosent aromatiske hydrokarboner og har vanligvis et høyt svovelinnhold (> 1 %).

2.2.1.6 Rekkefølgen av kjemiske komponenter som fjernes ved biodegradering

Bakterier bryter ned de fleste ulike komponentene i olje. Hvilke komponenter som brytes ned først avhenger av bl.a. biotilgjengelighet. Mikroorganismer fjerner følgelig de kjemiske komponentene som er lettest å metabolisere først. Fjerning av komponenter ved bakterier skjer i følgende rekkefølge i følge Connan (1984) og Killops og Killops (1993):

1. **Alkyl kjedene** (n-alkaner degraderes først, men lang-kjedete alkylbenzener affekteres også ved et tidlig stadium).
2. **Iso- og anteiso-alkaner**
3. **Sykloalkaner**
4. **Asykliske isoprenoider** (for eksempel pristan og phytan)
5. **C27 - C29 normale steraner**
6. **C30 - C35 hopaner**
7. **C21 - C22 normale steraner**
8. **Trisykliske terpaner**
9. **Aromatiske steroider**
10. **Metaller**

Forbindelsene 1-8 nevnt over er de som vanligvis analyserer ved GC-FID og GC-MS for å evaluere forløpet av biodegradering i petroleum geokjemi-sammenheng (Seifert & Moldowan, 1979; Ahsan *et al.*, 1997). Ved høy grad av biodegradering vil alle disse komponentene fjernes. Aromatiske steroider, som er mindre nedbrytbare kan da brukes for å identifisere oljer. Aromatiske steroider vil også bli affektet ved svært høy grad av biodegradering (Park, 1984; Wardroper *et al.* 1984).

For å kunne bestemme opprinnelsen av et oljesøl med sikkerhet er det viktig å analysere flere parametere. Metallinnhold og -forhold kan være til stor hjelp i denne sammenheng. V/(V+Ni) affekteres ikke av biodegradering. Rampersad (1987) sammenlignet parametere brukt for å identifisere forvitrede og uforvitrede oljer og konkluderer med at: "Mikrobiell nedbrytning kan føre til så store forandringer at, med unntak av muligens vanadium- og nikkelforholdet, vil dens egenskaper bli så forandret at den ikke vil gjenkjennes fra den opprinnelige oljen."

2.2.2 Forandring i sammensetning og giftighet ved søl av råolje

Skade på biologisk liv fra olje som tilføres det marine miljøet begynner ved at oljesøl i kystområder reduserer lysnivået og forhindrer oksygentilførsel fra atmosfæren. Bentske samfunn lider også skade når oljen synker til bunns i sjøen.

De langvarige effektene på økosystemet er relatert til giftige kjemiske komponenter som frigjøres fra oljen mens den brytes ned. De giftige stoffene overføres fra organismer i den lavere delen av næringskjeden til høyere nivåer. Tabell 4 er tatt fra Krahn og Stein (1998) og den viser at det hovedsakelig er de aromatiske komponentene som taes lett opp i organismene, som vedvarer i biologisk vev, og som er de mest giftige.

Tabell 4. Petroleum forbindelser i råolje og grad av giftighet (Krahn & Stein, 1998).

Table 4. Petroleum compounds of crude oil, and their degree of toxicity (Krahn & Stein, 1998).

Class	Abundance	Bioavailability ^a	Persistence in tissues	Toxicity
Aliphatic hydrocarbons	High	High	Low	Low
Alicyclic hydrocarbons (e.g., cycloalkanes, cycloalkenes)	High	High	Low	Low
Aromatics (e.g., parent and alkyl aromatic hydrocarbons, N- and S-heterocycles)	High	High	Variable, depending on species	Variable
Polar compounds (e.g., acids, phenols, thiols, thiophenols)	Low	Low	Low	Low
Elements (e.g., sulfur, vanadium, nickel, iron)	Low	Low	Low	Low
Insoluble components (e.g., asphaltenes, resins, tar)	Low	Low	Low	Low

(a) Bioavailability is that portion of the total concentration of a chemical that is potentially available for biological uptake by aquatic organisms.

2.2.3 Vitrifisering av olje

Vitrifisering av olje inkluderer prosesser som fordampning, emulsifisering, foto-oksidering og biodegradering.

2.2.3.1 Fordampning

Fordampning trer fort i kraft når olje søles. For eksempel var ca. halvparten av oljen som ble sluppet ut i den Arabiske Gulven under Gulf krigen i 1991 fordampet innen 24 timer (Killops & Killops, 1993). Fordampning medfører at de mer flyktige forbindelsene forsvinner og en mer viskøs blanding anrikt på asfaltener blir liggende igjen. Ved påvirkning fra bølger og strømninger brytes denne oljen opp. Tettheten av oljen vil etterhvert øke, ettersom de letteste komponentene fjernes, og oljen vil kunne synke ned til sjøbunnen.

2.2.3.2 Emulsifisering/Interaksjon med sjovann

Vind og bølger bryter oljen opp i små dråper som blandes med vann. Emulsjoner som dannes er relativt stabile og gjør oljen mer tilgjengelig for organismer.

2.2.3.3 Foto-oksidering

Molekylære komponenter i råolje blir fragmentert, og polare oksygen-grupper tilføyes molekylene under påvirkning av lys. Disse produktene er mer vannløselige, og metaboliseres lettere av mikroorganismer. Molekyler som ikke er polare er på den andre siden vanskelig å metabolisere, og akkumuleres lettere i vevet til organismer. Dette har langvarige implikasjoner for skadevirkninger. I den Arabiske Gulven ble det funnet at visse bakterier har evnen til å bruke også disse oljekomponentene som en karbon kilde. Bl.a. *Nocardia* arter nevnes av Chosson *et al.* (1991).

2.2.4 Fysikalske egenskaper til råolje

Egenvekt og viskositet er viktige fysikalske parametere som karakteriserer råoljer. Den kjemiske sammensetningen til en olje bestemmer hva de fysikalske parametere vil være. Jo høyere det relative innholdet av tunge NSO komponenter (resiner og asfaltener) i en olje, jo høyere vil egenvekten/tettheten og viskositeten være. Det er de oljene som er tunge med høy viskositet som også er de som inneholder mest svovel og giftige aromatiske forbindelser. Vitrifisering og biodegradering øker tetthet og viskositeten til oljer.

2.2.4.1 Tetthet eller API

Tettheten til råolje er en av de egenskaper som oftest er spesifisert. De fleste oljer er lettere enn vann og har en egenvekt som er $< 1 \text{ g/cm}^3$. Et alternativt mål på tetthet blir ofte brukt, og uttrykkes som grader av API.

$$^{\circ}\text{API} = (141,5/\text{Egenvekt ved } 15^{\circ}\text{C}) - 131,5$$

Egenvekt til en olje ved 15°C sammenlignes med egenvekten av vann ved samme temperatur. Lette oljer har for eksempel en API > 40 ° og tunge oljer har API < 10 °.

2.2.4.2 Viskositet

Enheden for viskositet er *poise*. Den defineres som det stress (dynes/cm²) som behøves for å få en forskjell i hastighet på 1 cm/sek mellom to lag av olje som er 1 cm fra hverandre (Gray & Darley, 1980). *Centipoise* er en hundredel av en poise.

Normale råoljer har en viskositet < 100 centipoises, mens tunge oljer har en viskositet opp til 100 000 centipoises (Tissot & Welte, 1984). Lav viskositet impliserer at oljen flyter lett, mens høy viskositet betyr at oljen må varmes opp for å få den til å flyte i det hele tatt.



Figur 4. Illustrasjon av variasjon i petroleumprøver. Venstre til høyre: Viskøs biodegradert olje som er blitt tung, brun lett Norsk olje, kondensater med forskjellig innhold av polar forbindelser, tung nafta og voks. En skifer oljebergart vises i forgrunnen.

Figure 4. Illustration of the variation in nature of petroleum samples. From left to right: Viscous biodegraded heavy oil, light Norwegian oil, condensates with differing contents of polar compounds, heavy naphtha and wax. An oil producing shale is shown in the foreground.

2.2.4.3 Farge

Variasjon i farge er illustrert i Figur 4. Farge er avhengig av innholdet av de tunge NSO molekyler (svart og brun) og aromater (gul).

2.2.5 Nedbrytning av olje

2.2.5.1 Mikrobiell nedbrytning av olje

Mikrobiell nedbrytning av hydrokarboner skjer ved en rekke forskjellige prosesser og av mange forskjellige mikroorganismer. Olje kan brytes ned aerobt og anaerobt, og ved lave såvel som høye temperaturer.

En vanlig aerob nedbrytningsvei av alifatiske hydrokarboner er ved β -okidasjon (Brock & Madigan, 1988; Gottschalk, 1986), selv om andre alternative nedbrytningsveier også er identifisert. Aerob nedbrytning av aromatiske forbindelser skjer ofte ved at oksygen inkorporeres i den aromatiske ringen, og ved en rekke suksessive trinn brytes ringen videre opp. Viktige intermediære forbindelser i denne prosessen er *cathecol* og *procathecuat* (Brock & Madigan, 1988; Gottschalk, 1986). Johns & Perry (1997) gjennomførte forsøk som indikerte at produksjon av karboksylsyren C20:5 er et kjennetegn for en metabolsk nedbrytningsvei som inkluderer inkorporering av oksygen (aerob nedbrytning).

Det har vært kjent lenge at polyaromatiske hydrokarboner (PAH) brytes ned aerobt (Cerniglia, 1992). Mange studier som har sett på anaerob nedbrytning av PAH har ikke påvist nedbrytning, og det har derfor lenge vært antatt at anaerob nedbrytning av hydrokarboner ikke forekommer (Brock, & Madigan, 1988; Gottschalk, 1986). Nyere studier viser imidlertid at også en rekke PAH-forbindelser kan brytes ned under anaerobe forhold, både under sulfatreduserende betingelser (Coates *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 1998; Young & Zhang, 1998) og nitrifiserende betingelser (Bonin *et al.*, 1994; Gilewicz *et al.*, 1991; Hutchins *et al.*, 1991). Mekanismene for nedbrytning er ikke tilstrekkelig beskrevet.

Nedbrytning av aromatiske hydrokarboner i grunnvann og sediment er ofte begrenset av lav tilgang på løst oksygen, ettersom aromatiske hydrokarboner brytes svært langsomt ned under anaerobe forhold (Wilson & Bouwer, 1997). Tilførsel av nitrat og mikroaerofile mengder av oksygen vil kunne stimulere nedbrytningen av aromatisk forurensing ved kombinert oksidasjon og denitrifikasjon (Wilson & Bouwer, 1997). Andre faktorer som kan være begrensende for nedbrytningshastigheten er nitrogen og fosfor (Rosenberg *et al.*, 1996). I de senere år er det kommet mye litteratur som viser at tilstedeværelse av jernmineraler fremmer nedbrytning av hydrokarboner.

Psykrotrofe mikroorganismer er spesielt tilpasset nedbrytning av hydrokarboner ved lave temperaturer (Whyte *et al.*, 1996). Oliver & Colwell (1973) viste at produksjon av C16:1 fettsyrer under nedbrytning var dominerende når degradering fant sted ved lave temperaturer. Det relative innholdet av C17 syrer økte med økende temperatur og tid. Det er derfor mulig at kjemiske parametere kan brukes til å si noe om forholdene som rådet og tidsforløpet som er gått siden biodegradering har funnet sted.

Det er en vanlig observasjon at antallet mikroorganismer som er i stand til å bryte ned en forurensing øker i miljøet når det blir utsatt for en slik forurensing. Bogardt & Hemmingsen (1992) bl.a. målte dette i diesel og kreosot-forurenset jord og vann.

2.2.5.2 Effekter av biodegradering på oljens innhold av jern

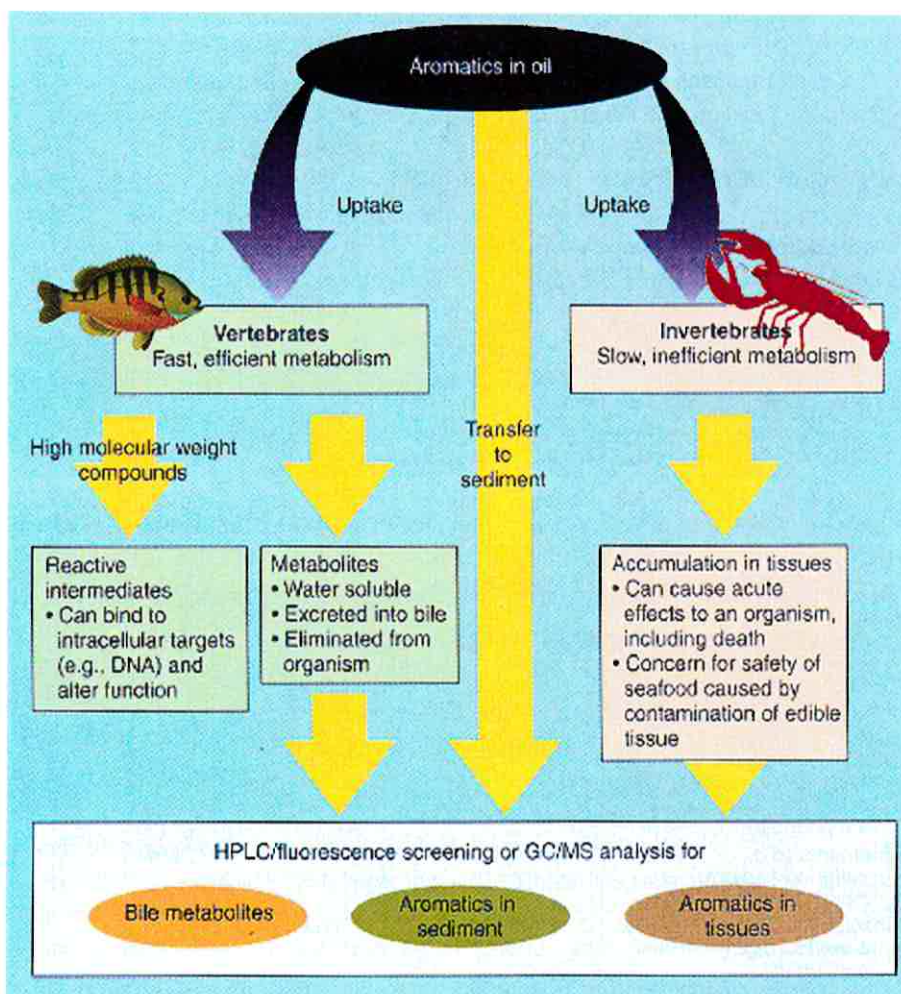
Det har blitt observert at i svært mange tilfeller (men ikke alle), har biodegraderte oljer et økt Fe-innhold sammenlignet med mindre nedbrutte oljer (Olsen, 1998). Høyt jerninnhold antas tilført av bakterier som bruker jernmineraler som elektronakseptor når de degraderer hydrokarboner under anaerobe forhold (Loveley *et al.*, 1994; Nealson & Myers, 1992). I de senere år har det blitt publisert en økende mengde litteratur som beskriver hvordan Fe og Mn reduserende bakterier oksiderer hydrokarboner under anoksiske forhold. Nealson & Myers (1992) gir i sitt review "Microbial reduction of manganese and iron: New approaches to carbon cycling", en innføring i konseptene denne type degradering innebærer. Review artikkelen er fokuset rundt det arbeidet de har gjort med organismen *S. putrefaciens* MR-1 og med Mn_(IV) og Fe_(III). Nealson & Myers (1992) hevder at dette arbeidet kun er spissen på isberget og at det finnes mange slike bakterier. Denne påstanden illustreres ved at når Nealson & Myers skrev artikkelen i 1992 hadde de isolert over 200 arter av Mn-reduserende bakterier i sitt eget laboratorium alene.

Loveley *et al.* (1994) demonstrerte hvordan tilførsel av organisk kompleks som binder Fe_(III) førte til økning i biotilgjengelighet av Fe_(III) til bakterier i sediment som var kontaminert med hydrokarboner/olje. Deres arbeid viste at når slike organiske komplekser (nitroloacetic acid) var tilstede, økte ratene for degradering av oljen i disse anoksiske sedimentene dramatisk. Biodegraderingsraten var like høy som når det var tilførsel av oksygen.

2.2.6 Metoder for å se på nedbrytning av olje

2.2.6.1 Metoder som er anvendt ved et oljesøl (SEC HPLC, GC, GC-MS, ICP-MS)

Ved oljesøl prioriteres det å spore opprinnelsen av sølet, evaluere omfanget av miljøskaden, og å se på toksiske effekter på biologisk liv. Prøver tas fra sediment og biologisk vev (f. eks. galle, lever og muskel). Analysemetoder må derfor først og fremst hjelpe til å identifisere oljen og bestemme innholdet av aromater i prøvene. I store undersøkelser av oljesøl (f. eks. Exxon Valdez), er det blitt funnet at kostnader og tid kan kuttes ned når kromatografi anvendes til en screening undersøkelse (Size exclusion (SEC) High performance liquid chromatography (HPLC) med fluorescence detektor). Forskjeller og likheter undersøkes først i oljen ved denne metoden (Krahn & Stein, 1998; Krahn *et al.*, 1993). Bruk av væskrokromatografi er raskt og relativt billig. Mer avanserte analyser behøves for å få mer detaljerte og nøyaktige svar. Utvalgte prøver blir da analysert ved bruk av GC-MS (gass kromatografi masse spektrometri), GC (gass kromatografi) og ICP-MS (Induktiv Koblet Plasma Masse Spektrometri). GC-MS gjør det mulig å bestemme de relative forholdene av aromater i petroleum (Sauer *et al.*, 1993; Krahn *et al.*, 1993; Burns *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1996; Krahn & Stein, 1998). Som vist i tabell 5, er det de aromatiske komponentene som er mest giftige. Forløpet av opptak av aromater, valg av prøvemateriale og analysemetoder illustreres i figur 5.



Figur 5. Illustrasjon av opptak av aromater i vertebrater og invertebrater og de analytiske metoder som brukes for å etablere konsentrasjoner av disse forbindelser i biologisk vev og sedimenter (fra Krahn & Stein, 1998).

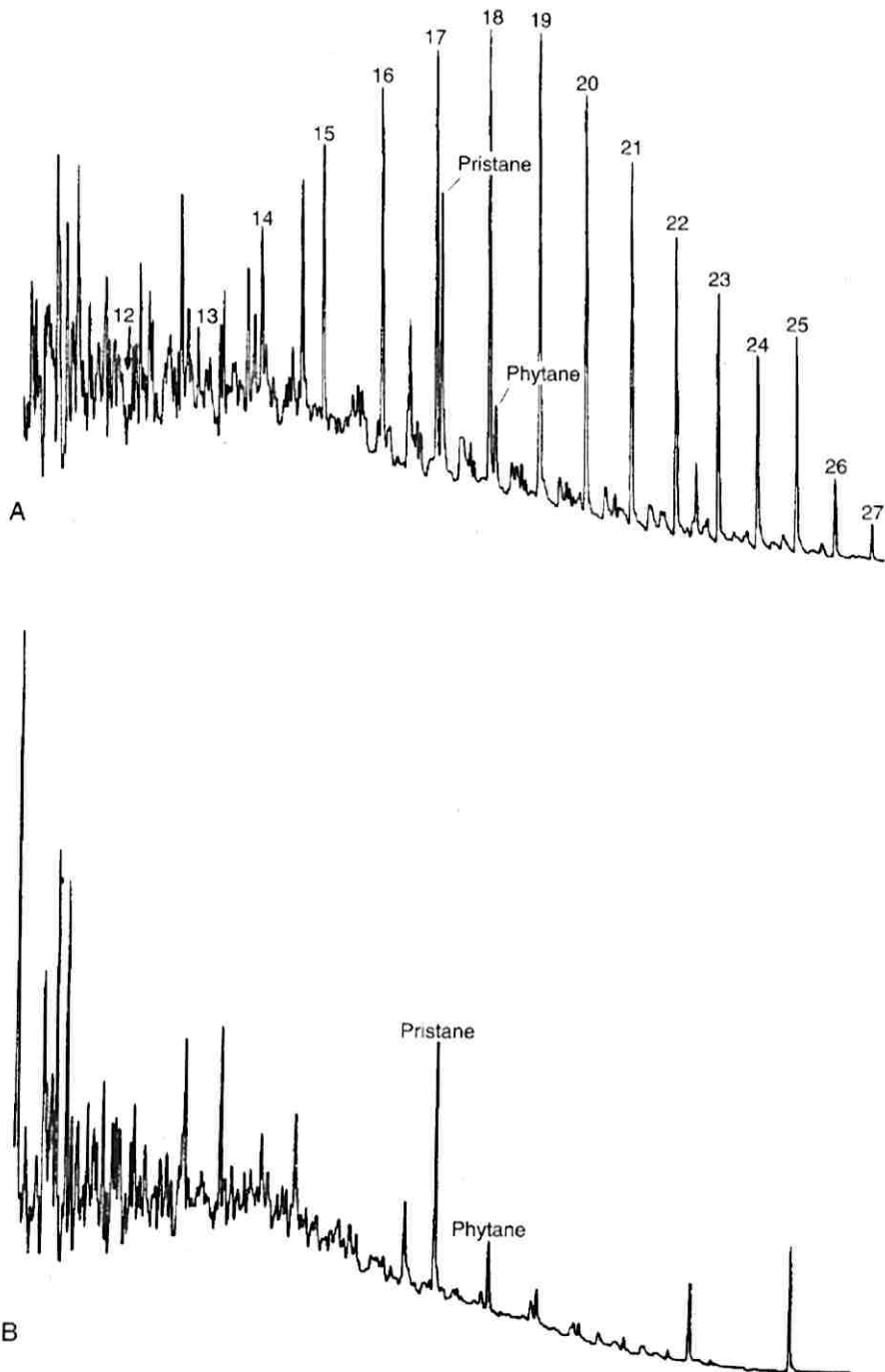
Figure 5. Fate of petroleum - related aromatic compounds taken up by vertebrates and invertebrates and analytical methods used to establish concentrations of these compounds in biota and sediments (taken from Krahn & Stein, 1998).

2.2.6.2 Informasjon om nedbrytningsgrad av olje fra GC (Gasskromatografi)

Som nevnt i 2.2.1.6, observeres det en klar sekvensiering i fjerning av molekylære typer ved biodegradering. Jo enklere strukturen til en kjemisk forbindelse er, jo mer biotilgjengelig/biodegraderbar er den. Analyse av de enklere og lav-molekylære forbindelsene (som også har et relativt lavt kokepunkt) utføres ved hjelp av GC-FID (GC med flamme ionisasjonsdetektor).

Jobson *et al.*, (1972) viste at gradvis fjerning av n-alkaner ved bakterier kan observeres ved å måle forholdet mellom pristan (Pr) og n-C₁₇ og phytan (Ph) og n-C₁₈. Et GC kromatogram fra en råolje som ikke er biodegradert er vist i figur 6. I den nederste delen av figur 6 vises et kromatogram av en biodegradert olje. Pr/n-C₁₇ og Ph/n-C₁₈ forholdene i denne figuren er endret fra ca. 0,5 for den øverste prøven til ca. 300 for den biodegraderte oljen i nederste halvdel av figuren. Størrelsen på dette forholdstallet gir en indikasjon på grad av biodegradering. Etter hvert som biodegraderingen

fortsetter, vil det ikke lenger være mulig å måle n-alkan topper på GC kromatogrammet. Forholdet Pr/UCM_{C17} kan da brukes inntil Pr heller ikke er målbart (UCM står for 'unresolved complex mixture' og bestemmes ved å måle høyden på humpen under Pr).



Figur 6. GC-FID kromatogrammer av en råolje som ikke er biodegradert og en som er degradert. Merk hvordan n-alkaner fjernes relativt til pristan (Pr) og phytan (Ph).

Figure 6. GC-FID chromatograms of a crude oil that has not been biodegraded compared to that of an oil that has been degraded. Note the removal of n-alkanes relative to pristan (Pr) and phytan (Ph).

2.2.6.3 Informasjon fra GC-MS om grad av biodegradering

I et overvåkningsprogram vektlegges data av analyse av giftige aromatiske forbindelser. Det vil være mulig å få en videre indikasjon på grad av biodegradering ved bruk av disse kjemiske forbindelser selv når det ikke lenger er mulig å måle Pr og Ph. Dvs. når også Pr og Ph er brutt ned. Roques *et al.* (1994) viser hvordan det relative forholdet til PAH endres med grad av biodegradering. Forholdet mellom C₁ fenantren og C₃ fenantren er høyt når biodegraderingsgraden er lav. Ved høy biodegraderingsgrad er C₁ fenantren til C₃ fenantren-forholdet veldig lavt. Det relative forholdet av de forskjellige steraner, hopaner og steroider som bestemmes ved GC-MS og som ble nevnt i 2.2.1.6 blir også brukt som en indikasjon på grad av biodegradering (Connan, 1984; Seifert & Moldowan, 1979).

2.2.6.4 Informasjon om grad av biodegradering basert på syreinnholdet i olje

Et biprodukt av biodegraderte råoljer er organiske syrer. Seifert & Teeter (1970) beskriver 1-, 2-, 3-, og 4-rings naften-syrer som ble identifisert i biodegraderte råoljer. C₁₆ og C₁₈ alkanoiske syrer ble funnet av Mackenzie *et al.* (1981), i oljer som hadde lav biodegraderingsgrad. Syreinnholdet (TAN eller total acid number) er en parameter som hittill ikke er blitt brukt for å bestemme biodegraderingsgrad, men Olsen (1995) har vist at det er et linjeært forhold mellom syre tallet (TAN) og biodegraderingsgrad.

2.2.6.5 Metall- og svovelinnhold som indikasjon på biodegraderingsgrad

Konsentrasjoner av metaller i råolje måles ved hjelp av Induktiv Koblet Plasma Massespektrometri (Olsen *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997; Olsen, 1998). Metall konsentrasjonen øker i direkte forhold med graden av biodegradering (Olsen, 1998). Dette er på grunn av at metaller finnes i porfyrin-enheter som er assosiert med asfalten og resin molekylene i oljen.

Tissot & Welte (1984) viser til at svovelinnholdet øker med graden av biodegradering siden bensotiofener og høymolekulære svovelforbindelser er mer motstandsdyktig overfor bakterier. Røntgenfluorescens kan brukes til å måle svovel innhold i råoljer. Tetthet, viskositet og innholdet av metaller og svovel korrelerer med hverandre.

3 Diskusjon; metodevalg og informasjon

3.1 Metoder for å undersøke mikrobielle samfunn

Metodene som er beskrevet for å se på antall, aktivitet og diversitet av mikroorganismer gir informasjon på ulike nivåer. Utviklingen av metoder innen for dette området, og spesielt RNA/DNA baserte metoder for å se på mikrobiell diversitet, har vært eksplosiv det siste tiåret, og svært mye av det arbeidet som har vært gjort har vært rettet nettopp mot metodeutvikling og tilpasning. Et kjennetegn er at jo mer detaljert informasjon metodene kan gi, jo mer komplisert er de å gjennomføre, og tolkningen av resultatene blir også vanskeligere. Spesielt metoder som er rettet mot å undersøke genetisk og

fylogenetisk diversitet gir komplekse svar. Jo mer komplekst prøvematerialet er, jo vanskeligere er det å analysere en representativ prøve og gi en realistisk tolkning av resultatene.

De fleste metodene er i utgangspunktet blitt utviklet og brukt for å se på spesifikke, definerte organismer/grupper i lite komplekse prøver. En vanlig tilnærming for bruk av slike metoder i mer komplekse miljøprøver har vært å bruke metodene for å gjenfinne/identifisere spesifikke, kjente arter, organismegrupper, eller genetiske egenskaper i en prøve. En tilnærming som går på å kartlegge en total, kompleks populasjon med hensyn på genetisk og fylogenetisk sammensetning og frekvens av mikroorganismer er svært komplisert og tidkrevende. Dette er følgelig ikke blitt gjort i stor grad. En aktuell problemstilling er, og vil fortsatt være, at det er bare en liten del av den informasjonen som finnes i det genetiske materialet som er beskrevet og som vi forstår betydningen av.

Mikrobielle samfunn gjennomgår forandringer når de utsettes for en ytre påvirkning. Slike endringene kan måles på ulike måter, der forskjellige tilnærminger vil gi svar på ulike nivåer. Det er - p.g.a. den enorme kompleksiteten som finnes blant mikroorganismer - langt frem for å gi en god, fullstendig beskrivelse av mikrobielle samfunn i marine miljøer basert på den metodikken som er tilgjengelig. Men, det vil likevel være mulig å påvise, med dagens kunnskapsnivå, at et miljø utsettes for en mer eller mindre definert forurensing ved å se på relativt enkle endringer i det mikrobielle miljøet. Slike endringer kan derfor benyttes som en indikator på hvilken tilstand miljøet er i. De mikrobielle forholdene kan dermed brukes som et verktøy for å bestemme forurensningsstatusen til et miljø.

3.2 Kjemiske metoder for å se på oljenedbrytning

Det er mulig å få informasjon om mikrobiell nedbrytning av olje ved å analysere på kjemiske komponenter i sedimentprøver. En god del arbeid gjenstår, men data i litteraturen viser at syresammensetningen og innhold av organisk bundet jern er komponenter som gir indikasjoner på forholdene og forløpet av mikrobiell nedbrytning av hydrokarboner. Noen eksempler er:

1) Syresammensetning målt ved GC-MS og FAB-MS

Hayes *et al.* (1998) sammenlignet mikroorganismer fra petroleum-kontaminert sediment med de som ble funnet i sediment som ikke var kontaminert, i San Diego Bay. De fant at PAH-degraderende bakterier bare var tilstede i de kontaminerte sedimentprøvene. Analyser av organiske syrer vil, i slike tilfeller, kunne gi informasjon om hvor lenge det er siden forurensingen fant sted og i hvilken grad det biologiske samfunnet i området fortsatt er utsatt for skadevirkninger av PAH. Burns (1993) viser til at PAH forbindelser oksideres ved metabolske prosesser og foto-oksidasjon. Young & Zhang (1998) presenterte arbeid der mekanismen for denne metabolske reaksjonen ble demonstrert ved bruk av radioaktivt merket karbon. Det ble for eksempel vist at 2-metyl naftalen metaboliseres i et tidlig stadium til 2-metyl naftanoisk syre. Ved fullstendig metabolisme konverteres PAH molekyler til CO₂. Spesifikke syrekomponenter (C_{20:5}) gir, ifølge Johns & Perry (1977), informasjon om hvorvidt

metabolske prosesser har foregått under anaerobe eller aerobe forhold. Det relative forholdet til organiske syrer bestemmes best ved bruk av negativ ione FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) (Large *et al.*, 1989; Olsen 1998).

2) Innhold av jern i olje

I naturlige miljøer bruker visse bakterier jernmineraler som elektronakseptor når de degraderer hydrokarboner. Dette fører til økte konsentrasjoner av organisk løst jern, som kan måles ved bruk av ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) eller INAA (Instrumental Neutron Activation Analysis). Det er mulig at jerninnholdet og forholdet mellom Fe/(V+Ni) kan brukes som en indikator på hvor stor innflytelse jern reduserende bakterier har hatt på nedbrytning av olje i et miljø.

Kjemiske analyser av slike parametre over tid etter at et oljesøl har inntruffet vil kunne gi informasjon om både hvorvidt en nedbrytning av oljen finner sted, og de kan gi indikasjoner på hvilke nedbrytingsmekanismer som finner sted.

4 Mikrobiell sammensetning som indikator på forurensing

Som det fremkommer av innholdet i denne rapporten finnes det er rekke metoder som kan benyttes for å se på mikrobielle populasjoner. Dette gjelder både totaltall av mikroorganismer, identifikasjon eller kvantifisering av spesifikke grupper/arter, og å bestemme total diversitet i en populasjon. Mikroorganismer finnes i store mengder i de fleste miljøer, og mikrobielle samfunn gjennomgår en endring som en respons på ulike typer påvirkning.

Mikrobielle samfunn kan endres relativt raskt når de utsettes for en påvirkning. Mikrobielle endringer kan være detekterbare i løpet av kort tid. Mikrobielle samfunn vil også kunne regenereres raskt når stress-situasjonen opphører. Dette er grunnen til at endringer i det mikrobielle miljøet vil være en god indikator for forurensningstilstanden til et miljø, både når en forurensningssituasjon oppstår, og som et mål for at systemet er tilbake til en normal, upåvirket tilstand.

4.1 Formål med ny metode for å vurdere forurensing

Hensikten med å etablere en metode for å vurdere forurensningstilstand i et marint habitat basert på mikrobiell sammensetning er delt:

- metoden må kunne gi et raskt og presist svar på forurensningstilstanden til miljøet
- metoden må være enkel og kunne benyttes som en screeningtest
- metoden må helst kunne erstatte andre mer komplekse metoder for å kartlegge forurensning, og/eller være med å redusere omfanget av andre analyser

Ved å kombinere en slik metode med andre analyser i forbindelse med et oljesøl, vil man kunne få et enda bedre system for å kunne overvåke miljøet i forbindelse med

kroniske og akutte utslipp, og man vil også være i stand til å beskrive når en forurenset lokalitet er restituert, basert på den mikrobielle sammensetningen i miljøet.

Formålet må være å komme frem til en **enkel screeningmetode** som er billig og lett å gjennomføre og som gir et pålitelig svar om hvorvidt en påvirkning finner sted, og som sammen med andre analyser også kan si noe om hvilken påvirkning det dreier seg om, og om omfanget av påvirkningen.

4.2 Hvordan kan den mikrobielle sammensetningen brukes som en indikator på forurensing?

En vanlig respons i et mikrobielt system som utsettes for stress er at balansen mellom mikroorganismene forstyrres, noe som normalt fører til redusert diversitet og, i mange tilfeller, en samtidig økt celletetthet (Atlas, 1984; Torsvik *et al.*, 1996). Den mikrobielle responsen overfor en spesifikk forurensing i kaldt og dypt vann eller sediment kan undersøkes ved å se på endringer i den mikrobielle populasjonen. Det mikrobielle samfunnet påvirkes som et resultat av forurensing, ofte ved en selektiv anrikning av mikroorganismer som en direkte respons på forurensingen, f. eks. ved at mikroorganismene bryter ned forurensingskomponenter, eller, ved at forurensingen er toksisk, og dermed hemmer vekst av enkelte organismer.

Undersøkelser som er gjort på endring i diversitet i den totale mikrobielle populasjonen samsvarer ikke nødvendigvis med diversitetsendringer i den dyrkbare fraksjonen i populasjonen (Torsvik *et al.*, 1996). Metoder som baserer seg på å se på endringer i den dyrkbare fraksjonene vil derfor ikke nødvendigvis gi et representativt bilde av endringer i den bakterielle populasjonen. Selv om de dyrkbare organismene ikke vil være representative for den totale mikrobielle populasjonen, vil man antagelig kunne forvente endringer også i den dyrkbare fraksjonen når populasjonen utsettes for en forurensning. Fordi det er vanskelig å forutsi hva endringer i den dyrkbare fraksjonen betyr for den totale populasjonsstrukturen bør imidlertid ikke vurderingsgrunnlaget avgrenses til bare å inkludere dyrkbare organismer.

Mengde og type mikroorganismer kan analyseres ved molekylære teknikker. Tilstedeværelse og relative mengder av ulike grupper mikroorganismer eller genetiske egenskaper i miljøet kan videre brukes direkte som en indikator på tilstedeværelse av en spesifikk forurensing. Hvilken informasjon ulike metodiske tilnærminger for å se på endringer i den mikrobielle populasjonen gir er diskutert kort nedenfor.

Hvilken informasjon kan man få ved å se på endringer i celletall og aktivitet?

Måling av totalt celletall i ulike prøver er en enkel, billig og lite tidkrevende metode som gir et raskt svar (f. eks. ved fluorescens mikroskopi metoder). Celletallet i ulike marine miljøer vil variere avhengig av i hvilken grad det påvirkes av ytre faktorer som predasjon (beiting ved heterotrofe flagellater og ciliater), virus, næringstilgang, sesongvariasjon etc. Det vil følgelig ikke være mulig å knytte endringer i celletall alene spesifikt opp mot en bestemt type forurensing. Måling av celletall i seg selv er følgelig ikke en aktuell screening-metode for å påvise oljeforurensning.

En kombinasjon av måling av celletall med teknikker for å se på spesifikke grupper av bakterier eller mikrobielle prosesser/ mikrobiell aktivitet kan være en brukbar tilnærming for å knytte endringer i celletall opp mot andre aktuelle parametere som sier noe om hvilke prosesser som potensielt er tilstede i miljøet. Eksempler er: bruk av oligonukleotid-prober spesifikke for spesielle indikatorbakterier (eks. *Pseudomonas*-gruppen; *Pseudomonas* arter er ofte funnet å bli dominerende i miljøer som utsettes for stress som ved oljeforurensning) eller for grupper av anaerobe mikroorganismer (hvis forholdene antas å være anoksiske), teknikker for å måle spesifikk enzymaktivitet (f. eks. enzymsystemer som går inn i kjente nedbrytningsveier for hydrokarboner) etc. Hvis f. eks. det relative innholdet av mikroorganismer som er i stand til å bryte ned PAH-forbindelser øker, kan dette brukes som en indikasjon på en PAH-forurensning.

Hvilken informasjon får man ved å bruke molekylære teknikker for å bestemme diversitet?

Å bestemme den genetiske diversiteten til et komplekst mikrobielt samfunn ved DNA/RNA metoder er blitt enklere og mer nøyaktig ved utvikling av stadig forbedrede metoder. Metodene er likevel tidkrevende, det er en rekke kompliserende metodiske tilpasninger, og det kreves en del spesialutstyr for å kunne utføre slike analyser. Noen metoder gir kvalitative data på fylogenetisk sammensetning i en prøve, mens andre metoder gir mer kvantitative tilnærminger. Felles for mange av metodene er at for å tolke den informasjonen som er tilgjengelig i en tilfeldig prøve må man ha god kjennskap til nært beslektede mikroorganismer fra før. Dette begrenser dermed vår mulighet til å bruke all den informasjonen som finnes i et slikt prøvemateriale. Tilstedeværelse av gener/fylogentiske grupper i et prøvemateriale gir ingen informasjon om hvorvidt de egenskapene genene koder for blir uttrykt i prøven.

RNA/DNA baserte metoder kan gi mål for total diversitet i en populasjon, de kan beskrive sammensetning og endring i tilstedeværende gener på detaljnivå, de kan brukes for å måle mikrobiell aktivitet ved innhold av rRNA i prøver etc. DNA baserte reassosiasjonsmetoder gir f. eks. et mål for antall dominerende genomer som finnes i en prøve, men kan ikke benyttes til å identifisere organismer i prøven.

Metoder basert på informasjon i genmateriale eller andre spesifikke cellekomponenter (f. eks fosfolipidsammensetningen) kan også benyttes til å se på generelle endringer i populasjonen som et resultat av forurensning. Ved å f. eks. fokusere på endringer i RNA/DNA forholdet, og ved å se på konsentrasjonen av totalt DNA vil man få et mål for mikrobiell aktivitet og populasjonsstørrelsen.

5 Forslag til videreføring

Vi har i dette arbeidet forsøkt å gjøre rede for hvorvidt det vil være mulig å bruke informasjon om mikrobiell sammensetning og aktivitet som en parameter for å bestemme om et område er forurenset med olje. Det mener vi er mulig, på forskjellige måter og ved å bruke ulike metoder!

For at en slik tilnærming skal være aktuell er det viktig å komme frem til en enkel, lett gjennomførbar metode. En aktuell tilnærming vil være en enkel metode basert på forholdet mellom spesifikke organismer og total mikrobiell populasjon. Metoden vil ikke gi direkte informasjon om type forurensning som inntreffer, men kan brukes til å avgrense det påvirkede området og som et ledd i å begrense omfanget av andre representative analyser som bør gjennomføres for å identifisere og bestemme omfanget av den aktuelle forurensningen.

Den kanskje enkleste metodiske tilnærmingen vil være å bruke mikroskopi. Gode metoder eksisterer for å se på totaltall av bakterier ved slike metoder. Ved å bruke f. eks. fluorescente fargestoffer som binder til spesifikke cellulære komponenter direkte, eller indirekte ved å bruke fluorescente fargestoffer knyttet til spesifikke prober, eller ved å detektere mikrobiell aktivitet ved at aktive celler farges spesifikt, kan endringer i populasjoner detekteres. For at dette skal være mulig kreves det imidlertid at målcellene finnes i en viss konsentrasjon i prøven (Amman *et al.*, 1995). Det er også mulig at lignende tilnærminger kan benyttes ved spektrofotometriske metoder, spesielt for å måle mikrobiell aktivitet.

Vi ser for oss at ettersom marine mikrobielle samfunn blir bedre karakterisert vil det være mulig å videreutvikle en slik screeningmetode til også å kunne gi mer spesifikk informasjon om type forurensning ved at det utvikles spesifikke markører/prober som kan brukes til å detektere mikroorganismer eller aktive enzym-systemer som er karakteristiske for ulike typer forurensning eller annen påvirkning.

Det er vanskelig, basert på dette litteraturstudiet, å velge den best egnede metodikken for å bestemme oljeforurensning basert på den mikrobielle populasjonen i det marine miljøet. Dette bør diskuteres nærmere med miljøer som arbeider med lignende problemstillinger.

5.1 Eksperimentell tilnærming

En mulig måte å undersøke potensialet for å utvikle en enkel screeningtest basert på mikrobiell sammensetning og antall som en forurensningsindikator (målt ved mikroskopiske metoder eller andre metoder hvis disse er mer aktuelle), er å sammenligne resultatene av slike enkle metoder med kjemiske metoder for å måle den aktuelle forurensningen, og med mer komplekse genetiske metoder (RNA/DNA-baserte) som bl.a ser på total diversitet. Dette kan gjøres ved å sammenligne resultater fra et komplett analyse-sett foretatt på de samme prøvene.

En tilnærming som kombinerer molekylære teknikker for å karakterisere mikrobiell diversitet på gen-nivå med eksperimentelle tilnærminger der man ser på påvirkning av veksten til spesifikke mikroorganismer eller grupper av mikroorganismer som et resultat av en forurensning kan være en brukbar metode til å undersøke effekter av forurensning i dypt og kaldt vann og sediment. I et studie utført av Langworthy *et al.* (1998) der de så på hvordan PAH påvirket den mikrobielle strukturen i et ferskvannssediment, ble følgende tilnærming benyttet: a) PAH konsentrasjonen ble bestemt, b) potensialet for nedbrytning av PAH ble målt ved å se på omsetning av radioktivist merkede substrater, c) den mikrobielle samfunns-strukturen ble karakterisert

ved PLFA, og d) tilstedeværelsen og frekvensen av nedbrytnings-gener ble målt ved DNA/RNA analyser. En lignende tilnærming kan også være aktuell for marine miljøer.

Vi kan tenke oss ulike eksperimentelle tilnærminger for å identifisere en egnet metode og teste ut metodens potensiale som screening-test for identifikasjon av oljeforurensning i marint miljø:

- 1) analysere naturlig prøvemateriale samlet inn fra ulike lokaliteter ved et komplett analyse-apparat. Man kan f. eks. starte med å sammenligne definerte "hot-spots" (høy forurensning) med rene lokaliteter. Strandsone-lokaliteter fra kalde eller tempererte områder, eller sediment fra dype havområder kan velges. Resultatene fra de ulike mikrobielle og kjemiske metodene sammenlignes så innbyrdes, og man kan videre sammenligne mønsteret mellom ulike lokaliteter ved de forskjellige analysene.
- 2) sette opp små-skala marine systemer i laboratoriet der man ser på endringer over tid når systemene utsettes for ulike forurensninger kombinert med andre påvirkninger, ved et tilsvarende analyse-apparat som i 1). Fordelen med laboratoriestudier er at det vil være lettere å lage representative kontrollsystemer, og det vil være lettere å sammenligne det samme systemet før og etter forurensning. Ulempen er at ingen av systemene vil bli helt representative for reelle naturlige forhold.
- 3) ett tredje alternativ er å kombinere begge disse tilnærmingene. Grundige laboratoriestudier vil gjøre det mulig å gi informasjon om hvilke analyser som er viktigst å teste ut på "naturlig" prøvemateriell. Metodetilpasning kan i større grad gjøres i forbindelse med laboratoriestudiene som vil være mer kontrollerte og enklere og billigere å gjennomføre da de ikke inkluderer felt-innsamling.

I utgangspunktet vil vi anta at en slik tilnærming for å bruke mikrobiell sammensetning som en indikator på forurensning er aktuell for alle typer marine miljøer, såvel som for andre miljøer. Det er mange måter å dele inn det marine miljøet på; men to hovedkategorier er **vannsøylen** og **sedimentet**.

For å se på potensialet av å etablere en screening-metode som beskrevet tror vi at det vil være lettest å se på sedimentet. Grunnen til det er at celletallet ofte er høyere i sedimentet sammenlignet med vannsøylen, og at det er "det samme" sedimentet som blir tatt prøve av på den samme lokaliteten ved ulike tidspunkt. Den mikrobielle sammensetningen i vannsøylen vil antagelig vise større variasjon over tid på samme lokalitet, og være mer sesongbetont. En ulempe med å bruke sediment som prøvemateriale er at sedimentpartiklene i seg selv kompliserer analysene.

6 Referanser

1. Amman, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. In *Microbiological reviews*, vol. Mar 95, pp. 143-169.

2. Ahsan, A., Karlsen, D.A., & Patience, R.L. (1997). Petroleum biodegradation in the Tertiary reservoirs of the North Sea. *Marine Petrol. Geol.*, 14(1), 55 - 64.
3. Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons; an environmental perspective. *Microbiological Reviews* 45, 180-209.
4. Atlas, R. M. (1985). Effects of hydrocarbons on microorganisms and petroleum biodegradation in arctic ecosystems. In *Petroleum effects in the Arctic environment* (ed. F. R. Engelhardt), pp. 63-99. Elsevier Applied Science Publishers.
5. Atlas, R. M. (1993). Detecting gene sequences using the Polymerase Chain Reaction. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 31 (ed. P. F. Kemp, Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.F.), pp. 267-270. Lewis Publishers.
6. Blackburn, N., Hagström, Å., Wikner, J., Cuadros-Hansson, R. & Bjørnsen, P. K. (1998). Rapid determination of bacterial abundance and growth by neural network-based image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3246-3255.
7. Bloem, J. (1995). Fluorescent staining of microbes for total direct counts. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 4.1.8 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-12. Kluwer Academic Publishers.
8. Bogardt, A. H. & Hemmingsen, B. B. (1992). Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlaying technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2579-2582.
9. Bonin, P., Ranaivoson, E. R., Raymond, N., Chalamet, A. & Bertrand, J. C. (1994). Evidence for denitrification in marine sediment highly contaminated by petroleum products. *Marine Pollution Bulletin* 28, 89-95.
10. Bratbak, G. (1993). Microscope methods for measuring bacterial biovolume: Epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 36 (ed. H. O. M. I. A. M. Ecology), pp. 309-318. Lewis Publishers.
11. Bregnard, T. P.-A., Häner, A., Höhener, P. & Zeyer, J. (1997). Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2077-2081.
12. Burns, K.A. (1993). Analytical methods used in oil spill studies. *Marine Pol. Bull.*, 26(2), 68 - 72.
13. Burns, W. A., Mankiewicz, P. J., Bence, A. E., Page, D. S. & Parker, K. R. (1997). A principal-component and least-squares method for allocating polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment to multiple sources. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY* 16, 1119-1131.
14. Button, D. K. & Robertson, B. R. (1993). Use of high-resolution cytometry to determine the activity and distribution of aquatic bacteria. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 21 (ed. P. F. Kemp, Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.F.), pp. 163-174. Lewis Publishers.

15. Campbell, L. (1993). Immunofluorescence method for the detection and characterisation of marine microbes. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 34 (ed. P. F. Kemp, Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.F.), pp. 295-300. Lewis Publishers.
16. Chosson, P., Lannau, C., Connan, J., & Dessort, D. (1991). Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. *Nature* 351, 640 - 642.
17. Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P. & Lovley, D. R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and environmental microbiology* 63, 3589-3593.
18. Connan, J. (1984). Biodegradation of crude oils in reservoirs. In *Advances in Petroleum Geochemistry Vol. 1*, Eds. Brooks, J., and Welte, D., Academic Press, London, pp. 299 - 335.
19. del Giorgio, P. A. & Cole, J. J. (1998). Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 29, 503-541.
20. Dell'Anno, A., Fabiano, M., Duineveld, C. A., Kok, A. & Danovaro, R. (1998). Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: Comparison of spectrophotometric, fluorometric, and high performance liquid chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Applied and environmental microbiology* 64, 3238-3245.
21. Dobbs, F. C. & Findlay, R. H. (1993). Analysis of microbial lipids to determine biomass and detect the response of sedimentary microorganisms to disturbance. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 40 (ed. P. F. Kemp, Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.F.), pp. 347-358. Lewis Publishers.
22. Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K. & Pace, N. R. (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3869-3877.
23. Drake, L. A., Choi, K.-H., Haskell, E. A. G. & Dobbs, F. C. (1998). Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquatic Microbial Ecology* 16, 17-25.
24. Fabiano, M. & Danovaro, R. (1998). Enzymatic activity, bacterial distribution and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3838-3845.
25. Fang, J. & Barcelona, J. M. (1998). Biogeochemical evidence for microbial community change in a jet fuel hydrocarbons-contaminated aquifer. *Organic Geochemistry* 29, 899-907.
26. Fang, J. S., Barcelona, M. J. & West, C. (1997). The use of aromatic acids and phospholipid-ester-linked fatty acids for delineation of processes affecting an aquifer contaminated with JP-4 fuel. *ACS SYMPOSIUM SERIES* 671, 65-76.

27. Fang, J. S. & Findlay, R. H. (1996). The use of a classic lipid extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS* **27**, 63-71.
28. Fry, J. C. & Zia, T. (1982). A method for estimating viability of aquatic bacteria by slide culture. *Journal of Applied Bacteriology* **53**, 189.
29. Fuhrman, J. A., McCallum, K. & Davis, A. A. (1993). Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans. *Applied and environmental microbiology* **59**, 1294-1302.
30. Fukuda, R., Ogawa, H., Nagata, T. & Koike, I. (1998). Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3352-3358.
31. Gilewicz, M., Monpert, G., Acquaviva, M., Mille, G. & Bertrand, J.-C. (1991). Anaerobic oxidation of 1-n-heptadecene by an marine denitrifying bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**, 252-256.
32. Gonzales, J. M. & Moran, M. A. (1997). Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4237-4242.
33. Gottschalk, G. (1986). *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag., New York, N.Y.
34. Gray, G.R., & Darley, H.C.H. (1980). Composition and properties of oil well drilling fluids. 4th Ed., Gulf Publishing, Houston, 630 pp., ISBN 0 87201 129 1.
35. Gray, J. P. & Herwig, R. P. (1996). Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4049-4059.
36. Hayes, L. A., Nevin, K. P., Coates, J. D. & Lovley, D. R. (1998). Anaerobic oxidation of naphthalene coupled to sulfate reduction in marine sediments and enrichment cultures. *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* **215**, 56-GEOC.
37. Higashihara, T. & Sato, A. (1985). Generic composition and degradation activity of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from the open sea. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **51**, 1015-1019.
38. Hirsch, P. R. (1995). Detection of microbial DNA sequences by colony hybridization. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 2.6.1 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-12. Kluwer Academic Publishers.
39. Hobbie, J. E. & Ford, T. E. (1993). A perspective on the ecology of aquatic microbes. In *Aquatic microbiology - an ecological approach*, vol. 1 (ed. T. E. Ford), pp. 1-15. Blackwell Scientific Publications, Boston.
40. Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**, 4765-4774.

41. Hunt, J.M. (1996). Petroleum geochemistry and geology. 2nd Ed., W.H. Freeman, New York, 743 pp.
42. Hutchins, S. R., Sewell, G. W., Kovacs, D. A. & Smith, G. A. (1991). Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environmental Science Technology* **25**, 68-76.
43. Jobson, A.M., Cook, F.D., Westlake, D.W.S. (1972). Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.*, 23, 1082 - 1089.
44. Johns, R.B. and Perry, G.J. (1977). Lipids of the marine bacterium *Flexibacter polymorphus*. *Arch. Microbiol.* 114, 267 - 271.
45. Johnston, W. H., Stapleton, R. & Sayler, G. S. (1996). Direct extraction of microbial DNA from soils and sediments. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 1.3.2 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-9. Kluwer Academic Publishers.
46. Karl, D. M. (1993). Total microbial biomass estimation derived from the measurement of particulate Adenosine-5'-Triphosphate. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 41 (ed. P. F. Kemp, Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.F.), pp. 359-368. Lewis Publishers.
47. Kato, C., Li, L., Tamaoka, J. & Horikoshi, K. (1997). Molecular analyses of the sediment of the 11,000 m deep Mariana Trench. *Extremophiles* **1**, 117-123.
48. Kepner Jr., R. L. & Pratt, J. R. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological reviews* **58**, 603-615.
49. Killops, S.D., & Al-Juboori, M.A.H.A. (1990). Characterisation of the unresolved complex mixture in the gas chromatograms of biodegraded petroleums. *Org. Geochem.* 15, 147 - 160.
50. Killops, S.D., & Killops, V.J. (1993). An introduction to organic geochemistry. Longman Scientific and Technical, Harlow, U.K., 265 pp., ISBN 0 582 080401.
51. Kjeilen, G., Vatland, A., Sanni, S., Jonsson, G., Torgrimsen, S., Bruchon, F., Øysæd, K. B. & Endresen, U. (1996). BIOREN - Phase III, Artificial Beach (Mesocosm) experiments. ELF Akvamiljø, Stavanger.
52. Krahn, M. M., Ylitalo, G. M., Buzitis, J., Chan, S. L., Varanasi, U., Wade, T. L., Jackson, T. J., Brooks, J. M., Wolfe, D. A. & Manen, C. A. (1993). Comparison of high-performance liquid-chromatography fluorescence screening and gas-chromatography mass-spectrometry analysis for aromatic-compounds in sediments sampled after the Exxon-Valdez oil-spill. *Environmental Science & Technology* **27**, 699-708.
53. Krahn, M.M., & Stein, J.E. (1998). Assessing exposure of marine biota and habitats to petroleum compounds. *Anal. Chem.*, 70(5), 186A - 192A.

54. Large, R. Tibbets, P. J. C. and Holland, A. J. (1989). FABMS analysis of surfactants and polar petroleum compounds. In "Petroanalysis '87, Ed. Crump, G. S., John Wiley, London, pp 99 - 112.
55. Leff, L. G., Dana, J. R. & Shimkets, L. J. (1997). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1141-1143.
56. Levorsen, A.I. (1967). *Geology of Petroleum*. Freeman, San Francisco.
57. Llobet-Brossa, E., Rossellò-Mora, R. & Amman, R. (1998). Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2691-2696.
58. Loferer-Krössbacher, M., Klima, J. & Psenner, R. (1998). Determination of Bacterial Cell Dry Mass by Transmission Electron Microscopy and Densitometric Image Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 688-694.
59. Lovley, D. R., Woodward, J.C. and Chapelle, F. H. (1994). Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe_(III) ligands. *Nature* **370**, 128 - 131.
60. Mackenzie, A. S., Wolff, G. A. and Maxwell, J. R. (1981). Fatty acids in some biodegraded petroleums. Possible origins and significance. *Adv. Org. Geochem*, John Wiley, London, pp 637 - 649.
61. Massol-Deya, A. A., Odelson, D. A., Hickey, R. F. & Tiedje, J. M. (1996). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 3.3.2 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-8. Kluwer Academic Publishers.
62. Murray, A. E., Preston, C. M., Massana, R., Taylor, L. T., Blakis, A., Wu, K. & Delong, E. F. (1998). Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2585-2595.
63. Muyzer, G., De Wall, E. C. & Utterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
64. Nealson, K.H., & Myers, C.R. (1992). Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *Appl. Environm. Microbiol.*, **58** (2), 439 - 443.
65. Noble, R. T. & Fuhrman, J. A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* **14**, 113-118.
66. Norton, T. A., Thompson, R. C., Pope, J., Veltkamp, C. J., B., B., Howard, C. V. & Hawkins, S. J. (1998). Using confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy and phase contrast microscopy to examine biofilms. *Aquatic Microbial Ecology* **16**, 199-204.

67. Oliver, J. D. and Colwell, R. R. (1973). Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: Fatty-acid composition. *Ing. J. System. Bacteriology*, 23 (4), 442 - 458.
68. Olsen, S. D., Filby, R. H., Brekke, T. and Isaksen, G. H. (1995). Determination of trace elements in petroleum exploration samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Instrumental Neutron Activation Analysis. *Analyst* 120, 1379 - 1390.
69. Olsen, S. D., Westerlund, S., and Visser, R.G. (1997). Analysis of metals in condensates and naphtha by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analyst*, 122, 1229 - 1234.
70. Olsen, S. D. (1998). The relationship between biodegradation, total acid number (TAN) and metals in oils. In *Preprints ACS Division of Petroleum Chemistry, Symposium on chemical analysis of crude oils for optimizing refinery yields and economics*, Eds. Sutterfield, F.D., and Sturm, G.P., Vol. 43, No 1, pp. 142 - 145.
71. Olsen, S.D. (1998). Development and application of Inductively Plasma - Mass Spectrometry for the analysis of metals in sedimentary organic matter. Ph.D. Thesis, University of Newcastle, U.K., 298 pp.
72. Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, E., Burns, W.A., Mankiewicz, P.J. (1996). *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1266.
73. Park, P.J.D. (1984). Crude oil biodegradation under simulated and natural conditions, II: aromatic steroid hydrocarbons. *Org. Geochem.*, 6, 605 - 617.
74. Paul, J. H. (1993). The advances and limitations of methodology. In *Aquatic microbiology - an ecological approach* (ed. T. E. Ford). Blackwell Scientific Publications, Boston.
75. Pichard, S. L. & Paul, J. H. (1996). Extraction of microbial RNA from aquatic sources: Marine environments. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 1.2.1 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-13. Kluwer Academic Publishers.
76. Pinhassi, J., Zweifel, U. L. & Hagstrom, A. (1997). Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3359-3366.
77. Prince, R. C. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology* 19, 217-242.
78. Rampersad, N.D.A. (1987). An investigation into the analytical methods employed for the comparison of weathered and unweathered oils and residue. Ph.D. Thesis, Thames Polytechnic, 253 pp.
79. Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. & Ridgway, H. F. (1992). Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1801-1808.

80. Rosenberg, E. (1992). The hydrocarbon-oxidizing bacteria. In *The Procarayotes*, vol. 19 (ed. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K-H Schleifer), pp. 446-459. Springer-Verlag.
81. Rosenberg, E., Legman, R., Kushmaro, A., Adler, E., H., A. & Ron, E. Z. (1996). Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. *Journal of Biotechnology* **51**, 273-278.
82. Sahm, K. & Berninger, U.-G. (1998). Abundance, vertical distribution and community structure of benthic procaryotes from permanently cold marine sediments (Svalbard, Arctic Ocean). *Marine Ecology Progress Series* **165**, 71-80.
83. Sauer, T.C., Brown, J.S., Boehm, P.D., Aurand, D.V., Michel, J., Hayes, M.O. (1993). *Mar. Pollut. Bull.*, 27, 117.
84. Schnürer, J. & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1256-1261.
85. Seifert, W.K., & Moldowan, J.M. (1979). The effect of biodegradation on steranes and triterpanes in crude oils. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43, 111 - 126.
86. Seifert, W. K. and Teeter, R. M. (1979). Identification of polycyclic aromatic and heterocyclic crude oil caroxylic acids. *Anal. Chem.*, 42 (7), 750 - 758.
87. Smith, E. M. (1998). Coherence of microbial respiration rate and cell-specific bacterial activity in a coastal planktonic community. *Aquatic Microbial Ecology* **16**, 27-35.
88. Suzuki, M. T., Rappe, M. S., Haimberger, Z. W., Winfield, H., Adair, J., Strobel, J. & Giovannoni, S. J. (1997). Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 983-989.
89. Tholosan, O. & Bianchi, A. (1998). Bacterial distribution and activity at the water-sediment boundary layer on NW Mediterranean continental margin. *Marine Ecology Progress Serier* **168**, 273-283.
90. Tissot, B.P., & Welte, D.H. (1984). Petroleum formation and occurrence. 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin, New York, 699p. ISBN 0 387 13281 3.
91. Torsvik, V. (1996). Cell extraction method. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 1.3.1 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-15. Kluwer Academic Publishers.
92. Torsvik, V. L., Sørheim, R. & Goksøyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 170-178.
93. Tuomi, P. (1997). Bacterial carbon production in the Northern Baltic: a comparison of thymidine incorporation and FDC based methods. *Marince Ecology Progress Series* **153**, 59-66.

94. Turley, C. M., Børsheim, K., Irriberry, J. & Prosser, J. (1996). The estimation of bacterial biomass in mediterranean seawater, pp. 10. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth Marine Laboratory.
95. Van Elsas, J. D. & Smalla, K. (1995). Extraction of microbial community DNA from soils. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 1.3.3 (ed. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. 1-11. Kluwer Academic Publishers.
96. Verity, P. G. & Sieracki, M. E. (1993). Use of colour image analysis and epifluorescence microscopy to measure plankton biomass. In *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, vol. 38 (ed. P. F. Kemp, Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.F.), pp. 327-338. Lewis Publishers.
97. Wardroper, A.M.K., Hoffmann, C.F., Maxwell, J.R., Barwise, A.J.G., Goodwin, N.S., & Park, P.J.D. (1984). Crude oil biodegradation under simulated and natural conditions - II. Aromatic steroid hydrocarbons. *Org. Geochem.* 6, 605 - 617.
98. Weinbauer, M. G., Beckmann, C. & Höfle, M. G. (1998). Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminium oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5000-5003.
99. Weinbauer, M. G. & Suttle, C. A. (1997). Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. *Aquatic Microbial Ecology* **13**, 225-232.
100. Whyte, L. G., Greer, C. W. & W.E., I. (1996). Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 99-106.
101. Wilson, L. P. & Bouwer, E. J. (1997). Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology* **18**, 116-130.
102. Young, L. Y. & Zhang, X. (1998). Microorganisms can metabolize PAH compounds in the absence of oxygen. *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* **215**, 57-GEOC.