



AALBORG UNIVERSITET
STUDENTERRAPPORT

Screening af stoffer til inhibering af sulfidoxidationen af *Acidithiobacillus* *thiooxidans* for beskyttelse mod mikrobiel induceret betonkorrosion i spildevandssystemer

Line Gade Frahm

Sune Popp Hinke

Aalborg Universitet

Kandidat i Vand og Miljø

Institut for Byggeri, By og Miljø (BUILD)

Kandidatspeciale (30 ECTS)

4. Juni 2025



AALBORG UNIVERSITET
STUDENTERRAPPORT

Department of the Built Environment

Vand og Miljø

Thomas Manns Vej 23

9220 Aalborg Ø

<https://www.build.aau.dk>

Titel:

Screening af stoffer til inhibering af sulfidoxidationen af *Acidithiobacillus thiooxidans* for beskyttelse mod mikrobiel induceret betonkorrosion i spildevandssystemer

Projekt:

Kandidatspeciale

Projektperiode:

februar 2025 - juni 2025

Gruppemedlemmer:

Line Gade Frahm

Sune Popp Hinke

Vejledere:

Asbjørn Haaning Nielsen

Jes Vollertsen

Sideantal: 43

Appendiks: 1

ECTS: 30

Afsluttet: d. 04-06-2025

Abstract:

Concrete corrosion caused by sulfuric acid represents a major challenge to wastewater infrastructures and leads to substantial global maintenance costs. Sulfuric acid primarily originates from the biological oxidation of hydrogen sulfide by bacteria such as *Acidithiobacillus thiooxidans* in sewer biofilm. This study investigates at a laboratory scale the inhibitory effect of various substances on the sulfide oxidizing activity of *A. thiooxidans* at a low pH (~ 2) in a closed bioreactor and in a microplate respirometry system. The tested substances included previously studied cement additives, nitrite and aluminum, and a selection of common biocides approved for industrial use in Denmark, including PCMC, benzoic acid, IPBC, DDAC, propiconazole, and DCOIT.

Results showed that 5 mg $\text{NO}_2^- \text{N L}^{-1}$ and 50 mg benzoic acid L^{-1} had an inhibitory effect on *A. thiooxidans* with reduced hydrogen sulfide oxidation rates compared to reference rates. A dose-response curve for nitrite was also conducted which indicated a $>90\%$ inhibition of oxygen uptake at 0.6 mg $\text{NO}_2^- \text{N L}^{-1}$ after 30 minutes of exposure. Aluminium showed no effect at the tested concentration, and PCMC, IPBC, DDAC, propiconazole, and DCOIT also did not demonstrate a clear inhibitory effect, likely due to reduced microbial activity from acclimation to low pH.

The results suggest a promising short-term inhibitory effect of nitrite and benzoic acid on *A. thiooxidans*, indicating potential for use as additives in concrete to mitigate microbiologically induced concrete corrosion.

Forord

Dette kandidatspeciale er udarbejdet af Line Gade Frahm og Sune Popp Hinke på kandidatuddannelsen Vand og Miljø på Aalborg Universitet.

Der skal lyde tak til gruppens to vejledere, Asbjørn Haaning Nielsen og Jes Vollertsen ved Institut for Byggeri, By og Miljø ved Aalborg Universitet, for vejledning gennem projektperioden. Et yderligere tak til Jytte Dencker, Henrik Koch, Giacomo Messina, Nanna Hong og Svend Jensen fra Vandmiljø Randers samt Louise Winter Grøn og Jannik Herskin fra Loligo Systems - for laboratoriehjælp og materialeindsamling.

Igennem rapporten vil der forekomme kildehenvisninger, som er samlet sidst i rapporten. Kildehenvisningerne er angivet som efternavnet på første-forfatteren og dernæst udgivelsesåret [Efternavn et al., år]. Figurer, tabeller og ligninger er nummereret afhængigt af kapitlet, disse befinder sig i. Første figur i kapitel 1 vil eksempelvis være angivet med nummer 1.1 og første figur i kapitel 2 vil være nummereret 2.1 og så videre.

Der er i løbet af projektperioden anvendt generativ AI i form af ChatGPT (OpenAI, 2024) til generering af kode i forbindelse med databehandling i R samt til enkelte sproglige formuleringer.


Line Gade Frahm


Sune Popp Hinke

Forkortelser

AAS cement alkali-aktiveret slagge cement

ASOM acidofile svovloxiderende mikroorganismer

CAC calcium aluminat cement

CO₂ kuldioxid

DCOIT 4,5-dichlor-2-octyl-3-isothiazol

DDAC didecyldimethylammonium chlorid

FNA fri salpetersyning

IPBC 3-iodo-2-propynylbutylcarbamate

NSOM neutrofile svovloxiderende mikroorganismer

OPC ordinær portlandcement

PCMC 4-chlor-3-methyl-phenol

SOB sulfidoxiderende bakterier

SRB sulfatreducerende bakterier

VFA flygtige fedtsyrer

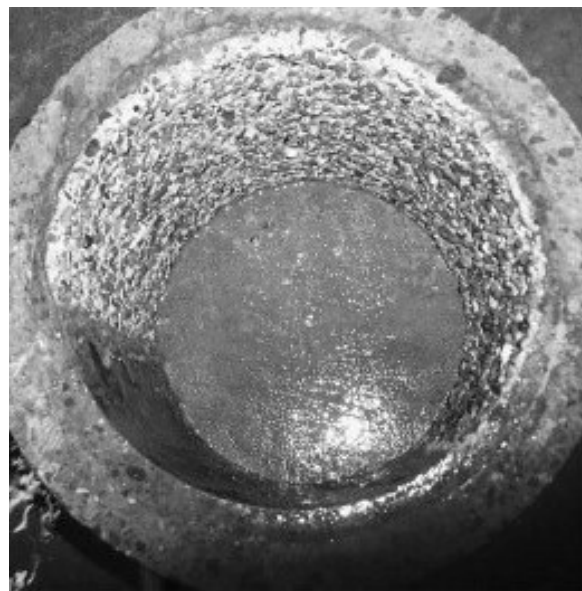
Indholdsfortegnelse

1	Indledning	1
1.1	Problemformulering	4
2	Svovlkredsløbet i afløbssystemer	5
2.1	Sulfidproduktion	6
2.2	Sulfidoxidation	6
2.2.1	Sulfidoxiderende bakterier og deres påvirkning på beton	7
3	Materialer og metoder	10
3.1	Indhentning og behandling af korrosionsmateriale	10
3.2	Forsøgsopstillinger	11
3.3	Analytisk procedure	13
3.3.1	Udvælgelse af teststoffer	13
3.3.2	Screening af teststoffer	14
3.3.3	Kemisk oxidation, diffusion og initialt iltforbrug	15
3.3.4	Eksponeringsanalyse af nitrit	16
3.4	Databehandling	17
3.4.1	Analyse af støkiometri	17
3.4.2	Analyse af sulfidoxideringsrater	18
3.4.3	Analyse af kemisk oxidation, diffusion og initialt iltforbrug	20
3.4.4	Eksponeringsanalyse af nitrit	20
4	Resultater	22
4.1	Effekt af pH	22
4.2	Baggrundsforbrug af ilt og svovlbrinte	24
4.3	Kinetik og støkiometri ved biotisk sulfidoxidation	26
4.4	Effekt af udvalgte teststoffer	27
4.5	Eksponeringsanalyse af nitrit	34
5	Diskussion	37
5.1	Effekt af nitrit på sulfidoxidation	37

5.2	Effekt af aluminum på sulfidoxidation	38
5.3	Effekt af udvalgte biocider på sulfidoxidation	39
5.4	Støkiometri, variation i rate og indikator for aktivitet	39
5.5	Praktisk implementering af teststoffer i spildevandsledninger	40
6	Konklusion	43
	Litteraturliste	44
	Appendix A Effekt af nitrit på <i>A. thiooxidans</i> iltforbrug	50

1. Indledning

Kloaksystemer udgør en af de mest fundamentale infrastrukturer i verden og spiller en afgørende rolle i det moderne samfund. Gennem de seneste 200 år har kloaksystemer udviklet sig markant og indbefatter i dag omfattende projekter med høje investeringsomkostninger [Pranik et al., 2024]. I Danmark forventes der investeringer i ledningsnettet inden for regn- og spildevand på mellem 5 og 8 mia. kr. årligt de næste 45 år [Hyldig et al., 2024]. Det er udbredt at bruge beton i gravitationsledninger i større spildevandssystemer, da det er mere modstandsdygtigt overfor høj belastning [Li & Jiang, 2022]. Spildevandsledningerne af beton er designet til at kunne holde op til 100 år med minimal vedligeholdelse.



Figur 1.1. Billede af et korroderet betonrør [Nielsen et al., 2008]

En væsentlig udfordring for kloaksystemernes levetid er betonkorrosion, som har været et kendt problem i over et århundrede [Kiliswa & Alexander, 2014; Li & Jiang, 2022]. Allerede i begyndelsen af 1900-tallet blev det identificeret, at svovlsyre, dannet i spildevandsledninger som følge af svovlbrinteoxidation, er den primære årsag til betonkorrosion [Kiliswa & Alexander, 2014]. Selvom svovlbrintedannelse traditionelt har været betragtet som et problem i varmere klimaer, har det vist sig også at kunne være en udfordring i tempererede områder som Danmark [Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. På figur 1.1 ses et udsnit af et korroderet betonrør, hvor specielt øvre halvdel er skadet. Det er ikke ualmindeligt, at raten for betonkorrosion er 2-3 mm årligt i Danmark [Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. Problemet blev særligt udtalt efter centraliseringen af renseanlæggene i 1980'erne, hvor længere transportafstande skabte højere opholdstid og dermed mere udbredte anaerobe forhold i spildevandsledningerne, der fremmer svovlbrintedannelse. Samme tendens ses den dag i dag, hvor centraliseret spildevandsrensning, separerede kloaksystemer og lavere vandforbrug ligeledes skaber længere opholdstid og mere koncentreret spildevand. Høje koncentrationer af svovlbrinte fører til en hurtigere nedbrydning af betonrør og pumpestationer, og kan i ekstreme tilfælde reducere levetiden for betonrør og pumpestationer til under 10 år, fra en ønsket levetid på omkring 100 år

[Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Jensen, 2009; Vollertsen et al., 2006].

Korrosionens økonomiske konsekvenser er betydelige, og mange lande afsætter store budgetter til vedligeholdelse og reparation af deres kloaksystemer [Pramanik et al., 2024]. Det er blandt andet estimeret, at kloakkorrosion i USA kan nærme sig en kostpris på 390 milliarder USD inden for de næste 20 år [Li & Jiang, 2022]. Udover de økonomiske konsekvenser er svovlbrinte ildelugtende og kan ved høje koncentrationer være direkte farlig over for mennesker [Li & Jiang, 2022].

I spildevandsledninger sker der en lang række komplekse biologiske og kemiske reaktioner. Der dannes blandt andet svovlbrinte ved reduktion af svovlforbindelser, hovedsagelig via sulfat, der forekommer i spildevandet. Anaerobe forhold i spildevandsfasen understøtter væksten af sulfatreducerende mikroorganismer, der omdanner sulfat til svovlbrinte [Herisson et al., 2014]. Svovlbrinten frigives til luftfasen i spildevandsledningen, hvor den absorberes af biofilm på betonoverfladen. Dette sker typisk i gravitationsledninger, der både har et vådt areal og en kloakatmosfære [Herisson et al., 2014; Li & Jiang, 2022]. På betonoverfladen oxideres svovlbrinten og andre svovlindeholdende mellemprodukter af sulfidoxiderende bakterier, særligt under slægten *Acidithiobacillus*, som producerer svovlsyre – den primære årsag til betonkorrosion [Herisson et al., 2014; Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. Disse bakterier trives ved meget lav pH, hvor den største synder, *A. thiooxidans*, kan accelerere korrosionen markant ved pH-værdier mellem 0,5 og 5 [Hvitved-Jacobsen et al., 2013].

Den biotiske oxidationsrate er meget højere end den kemiske oxidationsrate, og derfor betragtes mikrobiel korrosion på betonoverflader som hovedårsagen til svovlbrinterelateret nedbrydning af spildevandsledninger [Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Li & Jiang, 2022]. En lang række studier har undersøgt muligheden for at forbedre modstandsdygtigheden af betonrør i afløbssystemer overfor mikrobielt induceret korrosion [Pramanik et al., 2024]. Disse beskyttelsestiltag inkluderer blandt andet kemisk overfladebehandling, foring med polymerer, kemiske tilsætningsstoffer, overfladevask og alternative typer af bindingsmidler (Cementtyper og polymerbeton) [Pramanik et al., 2024]. Ulemperne ved størstedelen af disse kan dog være, at kemikalierne er kostbare eller skadelige for miljøet, høje udgifter til vedligeholdelse, og vanskeligheden i at behandle indersiden med overfladebehandling [Sun et al., 2015]. Udover dette fungerer det ofte som midlertidige løsninger, der regelmæssigt skal påføres, hvilket kan forårsage forstyrrelser i kloakdriften samt være bekostelige [Li et al., 2020a].

Flere undersøgelser har påvist en øget holdbarhed overfor syreangreb ved brug af calcium aluminat cement (CAC) eller nitrit sammenlignet med ordinær portlandcement (OPC) [Christensen et al., 2020; Herisson et al., 2018, 2013; Khan et al., 2019; Kiliswa et al., 2019; Lørs et al., 2017; Song et al., 2019; Ukrainczyk & Grengg, 2023]. CAC virker ved at reagere med svovlsyre og danne en aluminiumsgel, der fungerer som en fysisk beskyttende barriere og stabiliserer pH på omkring 4

[Herisson et al., 2013; Herisson et al., 2014]. Der er også hypoteser om, at CAC har en bakteriostatisk effekt som følge af frigivelse af aluminiumsioner (Al^{3+}) ved lav pH [Herisson et al., 2017, 2013]. Andre undersøgelser viser, at de sulfidoxiderende bakterier hurtigt vil tilpasse sig høje koncentrationer af Al^{3+} [Buvignier et al., 2019b]. For nitrit er der blevet påvist et 30% lavere korrosionstab samt en 30% lavere sulfidoptagsrate for nitrit-indeholdende beton eksponeret for virkelige kloakforhold sammenlignet med OPC over en forsøgsperiode på 18 måneder [Li et al., 2020a]. Når nitrit er i sure miljøer, vil der dannes fri salpetersyning (FNA) (HNO_2 , $\text{pK}_a = 3,16$, 25°C), som har vist sig at have en stærk bakteriostatisk effekt. Koncentrationer på $0,1\text{-}0,3 \text{ mg HNO}_2\text{-N L}^{-1}$ med en eksponeringstid på 6-24 timer reducerer de tilgængelige mikroorganismer i kloakbiofilmen med 65-75% [Jiang et al., 2011]. Der er yderligere påvist en direkte inhiberende effekt af FNA på sulfidoxiderende mikroorganismer ved en pH på 2,7-3,8, hvor sulfidoptaget blev reduceret med 80-90% efter eksponering med FNA [Sun et al., 2015].

Stofferne, der tilsættes betonen, kan dog være omkostningsfulde og i nogle tilfælde også sværere at arbejde med end ordinære bindingsmidler. Undersøgelserne med aluminium- og nitrit-indeholdende beton bekræfter dog potentialet i at kunne tilsætte stoffer til beton, der kan inaktivere de syredannende bakterier i kloakken, for at opnå en længerevarende beskyttelse. En anden mulighed for tilsætning er biocider. Biocider bruges eksempelvis til at bekæmpe mikrobiel vækst, og er meget anvendt i byggematerialer såsom puds, maling og træimprægnering. De behandlede materialer er omfattet af Bekæmpelsesmiddelbekendtgørelsen, der er et supplement til EU's regler om produktion, import, godkendelse og anvendelse af bekæmpelsesmidler angivet i Biocidforordningen [Retsinformation, 2024]. Dette åbner op for muligheden for at tilsætte biocider i betonen i spildevandsledninger, til en potentiel inaktivering af de svovlsyredannende bakterier af arten *A. thiooxidans* på betonoverfladen. Foruden kravet om at det skal være godkendt til industriel brug, skal biocidet også helst være syrestabilt, have en bakteriostatisk effekt og have en lav vandopløselighed. Sidstnævnte for at undgå udvaskning fra betonen, samt at bibeholde en længerevarende beskyttelse.

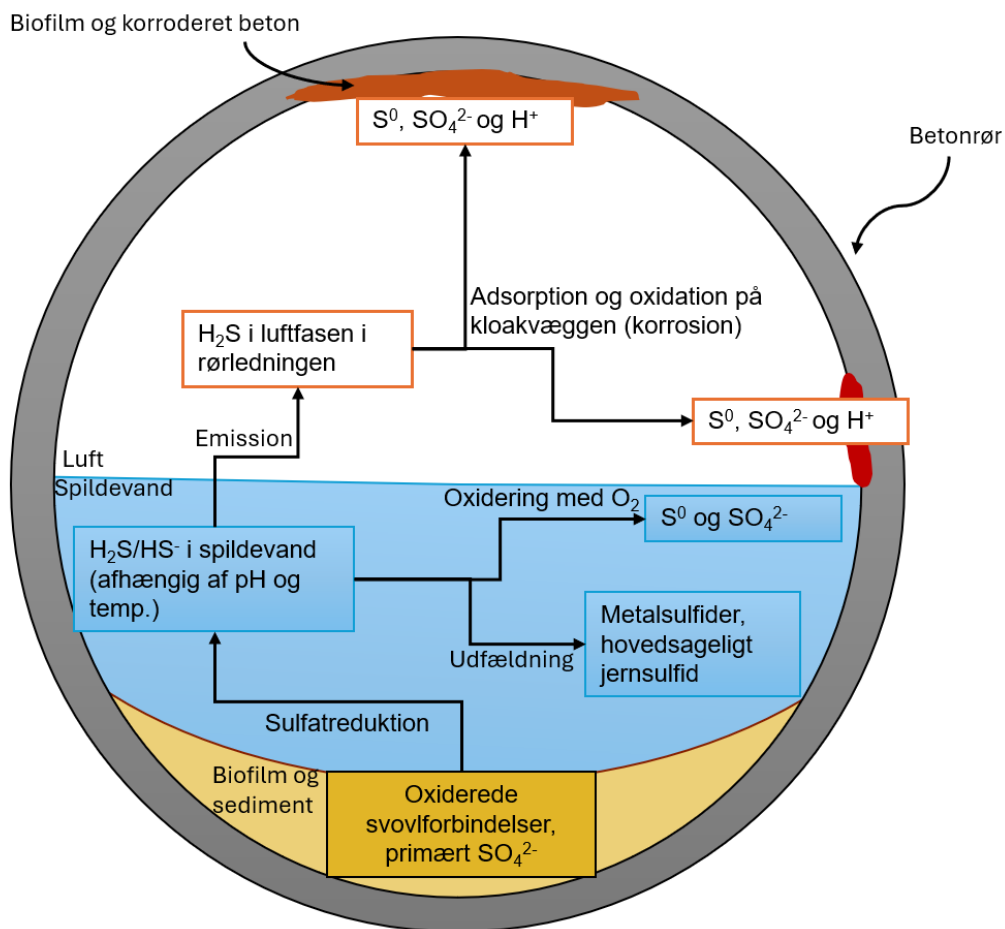
1.1 Problemformulering

For at mindske mikrobiel induceret betonkorrosion og de dertilhørende reparationsomkostninger, ønskes det i følgende rapport at screene forskellige stoffers inhiberende effekt på svovlbrinteoxiderende bakterier ved en pH på ~2. Undersøgelsen fokuserer både på tidligere studerede cementtilsætningsstoffer, herunder nitrit og aluminium, samt en række af de mest anvendte biocider godkendt til brug i Danmark, herunder 4-chlor-3-methyl-phenol (PCMC), benzoesyre, 3-iodo-2-propynylbutylcarbamate (IPBC), didecyldimethylammonium chlorid (DDAC), propiconazol og 4,5-dichlor-2-octyl-3-isothiazol (DCOIT) . Målet er at identificere stoffer, som effektivt inhiberer *A. thiooxidans*, og som, ved tilsætning til betonen i spildevandsledninger, potentielt kan yde en langsigtet beskyttelse overfor syreangreb. I løbet af rapporten ønskes følgende spørgsmål besvaret:

- Hvordan påvirkes raten for biotisk sulfidoxidation, når *A. thiooxidans* eksponeres for forskellige teststoffer?
- Hvilke teststoffer har den største inhiberingseffekt på *A. thiooxidans*?
- Ved hvilke koncentrationer observeres der et højt inhiberingsrespons for udvalgte teststoffer?

2. Svovlkredsløbet i afløbssystemer

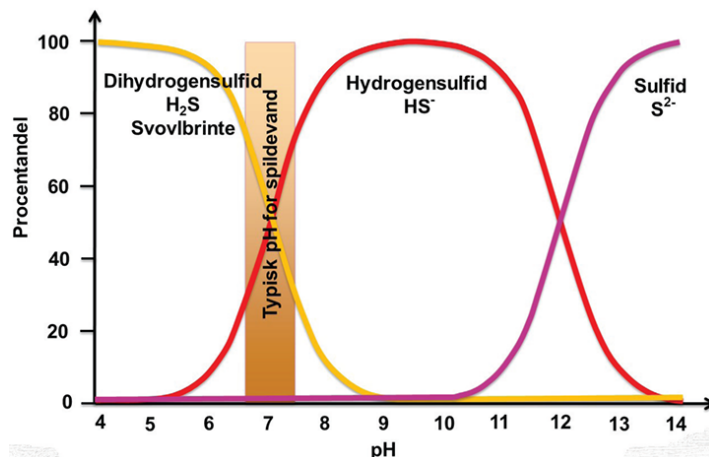
Svovl spiller en vigtig rolle i kemiske og biologiske processer i afløbssystemer. Svovl bliver tilført spildevandsledninger igennem spildevandet, typisk som sulfat, grundet en høj forekomst i grundvandet med en typisk baggrundskoncentration på 20-50 mg L⁻¹ [Mossin & JaKobsen, 2006]. Svovlkredsløbet i afløbssystemer kan inddeles i både aerobe og anaerobe processer, hvor svovlforbindelser bliver hhv. oxideret og reduceret [Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Li et al., 2024]. På figur 2.1 kan der ses et overblik over de vigtigste svovlreaktioner i spildevandsledninger.



Figur 2.1. Oversigt over de forskellige svovlprocesser i en spildevandsledning. Inspireret af Hvitved-Jacobsen et al. [2013].

2.1 Sulfidproduktion

I spildevandsledninger skyldes størstedelen af sulfiddannelsen sulfatreducerende bakterier (SRB) [Herisson et al., 2014; Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Liu et al., 2015]. Sulfat stammer hovedsageligt fra drikkevand, rengøringsartikler, produkter til personlig pleje og indsigende grundvand [DANVA, 2019]. Under anaerobe forhold, fx i biofilm eller sedimenter, reduceres sulfat af SRB i forbindelse med deres respiration [Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Nielsen et al., 2004; Nielsen et al., 2006]. Her bruges sulfat som



Figur 2.2. Sammenhæng mellem sulfids tilstandsformer og pH i en vandig opløsning [DANVA, 2019].

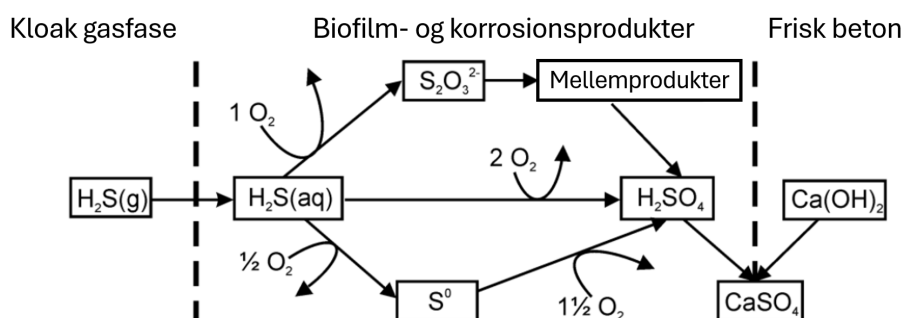
elektronacceptor som et alternativ til ilt, hvilket reducerer det til sulfid [Kiliswa & Alexander, 2014]. Sulfid forekommer primært i spildevand på opløst form, og grundet syre-base ligevægten, der afhænger af pH værdien, kan det eksistere på forskellige former i vandfasen, som illustreret på figur 2.2. Ved en pH på omkring 7 ($pK_a = 7,1$, 25°C) vil halvdelen af den opløste sulfid optræde som hydrogensulfid ion (HS^-) og halvdelen som dihydrogensulfid (H_2S , svovlbrinte). Ved lavere pH vil ligevægten forskydes mod svovlbrinte [Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. Det er kun den uioniserede form af sulfid, svovlbrinte, der kan gå på gasform og dermed diffundere op i kloakatmosfæren. Spildevand i gravitationsledninger har oftest en pH værdi på 7-8, og der vil derfor altid være en fraktion af svovlbrinte tilstede [Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. Typisk kan vandet i trykledninger blive mere surt som følge af fermentationsprocesser, hvor der dannes flygtige fedtsyrer (VFA) samt kuldioxid (CO_2). Disse processer bidrager til en lavere pH, hvilket øger andelen af uioniseret sulfid [Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. Det er først når svovlbrinte diffunderer op i kloakatmosfæren, at den bliver problematisk, da det kan skabe store lugtgener eller reoxidere, som bliver beskrevet nærmere i afsnit 2.2 [DANVA, 2019; Kiliswa & Alexander, 2014].

2.2 Sulfidoxidation

Oxidationen af svovlbrinte finder sted under aerobe forhold. Det sker i forbindelse med, at svovlbrinte i gasfasen absorberes i biofilmen på indersiden af betonrørene. På betonoverfladen, hvor der typisk er tilstedeværelse af ilt, oxideres svovlbrinten til svovlsyre gennem en kemisk auto-oxidation eller biologisk via sulfidoxiderende bakterier (SOB) [Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Kiliswa & Alexander,

2014]. Korrosionen er særligt udbredt i de områder af betonrøret, der er udsat for høj fugtighed og stor næringsstofftilførsel. Disse indebærer området lige over vandfasen samt i kronen af betonrøret [Hvitved-Jacobsen et al., 2013]. Dette er illustreret på figur 2.1.

Ved sulfidoxidation sker der en række reaktionsforløb, som er illustreret på figur 2.3. Figuren viser oxidationen af svovlbrintegas til svovlsyre gennem mulig dannelse af mellemprodukter såsom elementært svovl, thiosulfat, samt det støkiometriske iltforbrug af de respektive reaktioner [Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Islander et al., 1991; Jensen, 2009].



Figur 2.3. Mulige reaktionsforløb for sulfidoxidation i en spildevandsledning. Oversat fra Jensen [2009].

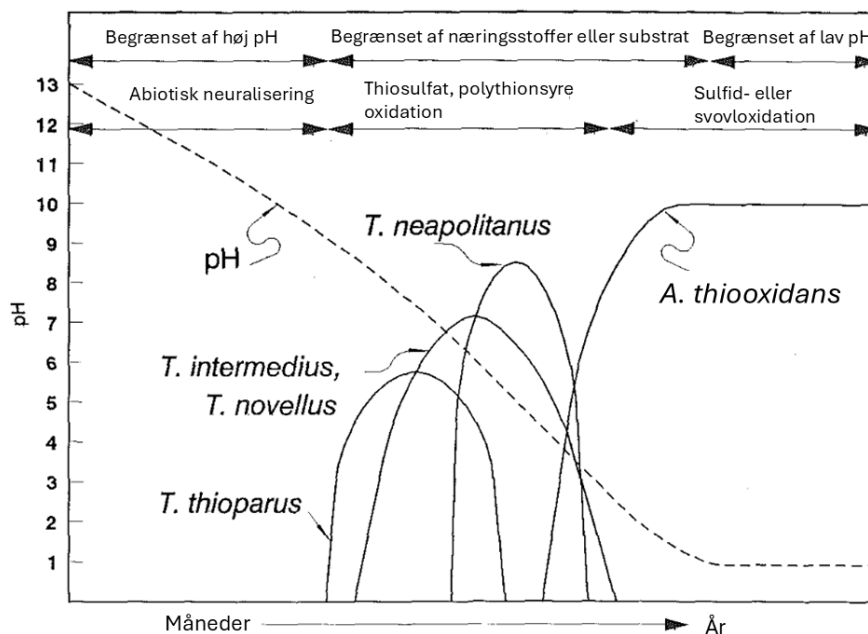
Mellemprodukterne kan videre blive omdannet til sulfat. Under sure forhold vurderes elementært svovl at være det dominante mellemprodukt i sulfidoxidationen [Islander et al., 1991]. Efter alt sulfid er opbrugt, kan de acidofile svovloxiderende mikroorganismer (ASOM) udnytte et opbygget lager af elementært svovl som elektrondonor til at producere svovlsyre [Kleinjan et al., 2003; Jensen, 2009].

2.2.1 Sulfidoxiderende bakterier og deres påvirkning på beton

SOB trives under meget sure forhold, hvilket er en fordel, da lav pH vil inhibere de fleste andre mikroorganismer, og dermed vil SOB have favorable forhold [Islander et al., 1991]. SOB består hovedsageligt af slægten *Acidithiobacillus*. Det er bl.a. påvist, at arten *A. thiooxidans* er til stede i høje koncentrationer i korroderet beton [Islander et al., 1991]. Bakteriearten lever ved en pH på 0,5-6 og temperatur på 2-40 °C, men har sit optimum ved pH 2-3,5 og 28-30°C [Islander et al., 1991; Suzuki et al., 1999; Yang et al., 2019].

Beton har som udgangspunkt en meget basisk pH på omkring 12-13 og er derfor teoretisk ikke et sted, hvor *A. thiooxidans* ville kunne overleve. CO₂, der er tilstede i kloakens luftfase (typisk koncentration på 500-10.000 ppm), medvirker til kemisk neutralisering af betonoverfladen, som reducerer pH til cirka 9 [Hvitved-Jacobsen et al., 2013; Ismail et al., 1993]. Ved denne pH begynder neutrofile

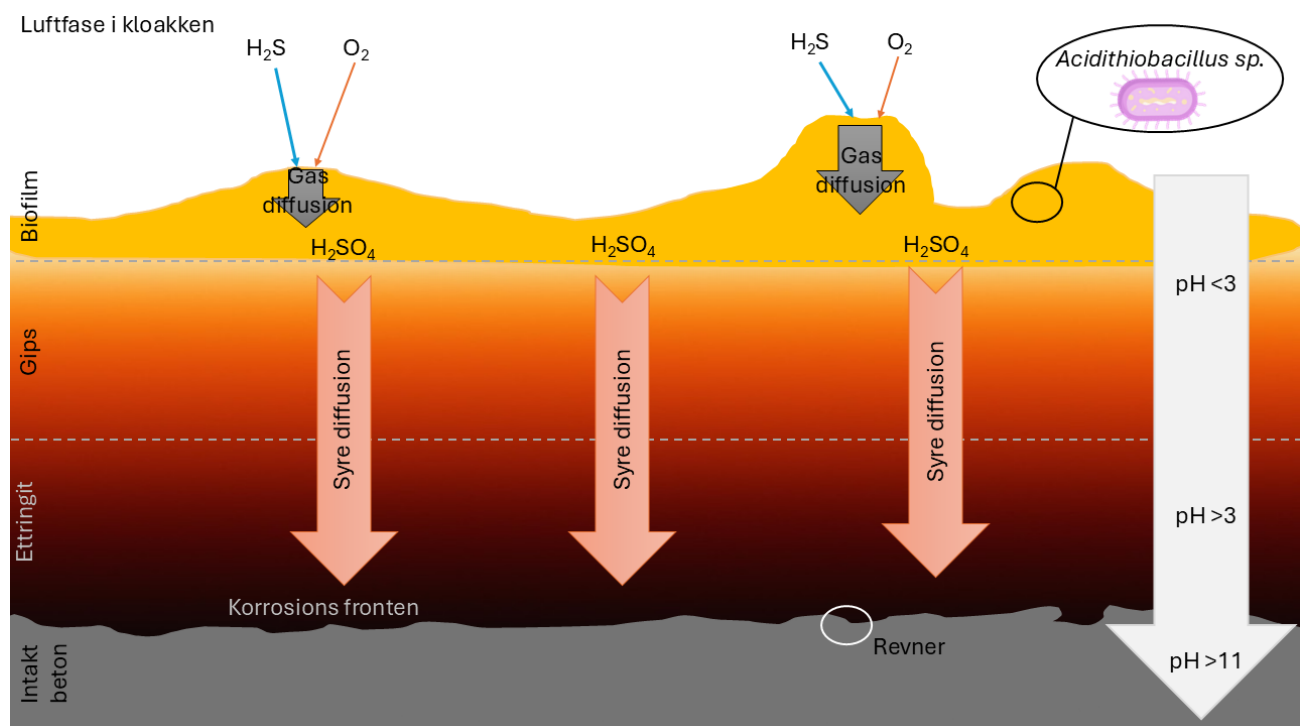
svovloxiderende mikroorganismer (NSOM) (*T. thioparus*, *T. intermedius*, *T. novellus* og *T. neapolitanus*) at etablere sig under favorable forhold med høj fugtighed, temperatur og med god næringsstofftilgængelighed fra spildevandet [Islander et al., 1991]. Væksten af NSOM forårsager et yderligere fald i pH ved dannelse af forskellige syreprodukter som følge af sulfid- og thiosulfatoxidation [Roberts et al., 2002]. Når pH rammer 5, begynder ASOM (såsom *A. thiooxidans*) at kolonisere betonoverfladen og oxidere sulfid eller mellemproduktet elementært svovl til svovlsyre, som reducerer pH yderligere på betonoverfladen og accelererer korrosionen [Islander et al., 1991]. Dette giver gunstige vækstforhold for *A. thiooxidans*, der kun vil være begrænset af reducerede svovlforbindelser. Udover reducerede svovlforbindelser er CO₂ og kvælstof nødvendigt for vækst. Det vurderes dog, at koncentrationen af CO₂ og kvælstof, som følge af henholdsvis biologisk aktivitet i spildevandet og en generel høj koncentration af ammoniak-N i kloak-atmosfæren, er høj nok til ikke at begrænse væksten. Et overblik over svovloxiderende bakterier under forskellige pH-forhold, samt hvilke svovlforbindelser de oxiderer, kan ses på figur 2.4. Det ses, at ved en pH på under 3, vil *A. thiooxidans* være den eneste tilbageværende art af svovloxiderende bakterier på betonoverfladen. Væksten af *A. thiooxidans* vil blive begrænset ved en pH på 0.9 [Islander et al., 1991; Kempner, 1966]. Derfor vil pH på betonoverfladen balancere sig ved en pH-værdi på omkring 1, hvor syreproduktionen fra *A. thiooxidans* er lig udvaskningen og neutraliseringskapaciteten fra betonen [Islander et al., 1991].



Figur 2.4. Teoretisk overblik over økologisk succession af forskellige svovloxiderende bakterier gennem en korrosionsproces som funktion af pH over tid. Oversat fra Islander et al. [1991].

Svovlsyre, som genereres af ASOM via sulfidoxidation i biofilmen på betonoverfladen, vil diffundere mindst 2 mm ind i korrosionslaget mod det intakte beton, som det kan ses på figur 2.5 [Okabe

et al., 2007]. Her vil det reagere med calciumsilikater og -hydroxider i betonen og danne gips ved en pH-værdi under 3 [Li et al., 2017]. I en undersøgelse, hvor beton blev udsat for virkelige kloakforhold i et år, blev tykkelsen af biofilmslaget, med en høj koncentration af *A. thiooxidans*, bestemt til 1,5 mm, og gipslagets tykkelse bestemt til 10 mm med en pH imellem 1,6–2,7 [Okabe et al., 2007]. Tættere ved den intakte beton, ved en pH-værdi over 3, reagerer gips med calciumaluminathydrat og danner ettringit. Hvis pH-værdien falder, kan ettringit igen omdannes til gips [Li et al., 2017]. Generelt afhænger tykkelsen af gips- og ettringitlaget af sulfatkoncentrationen og pH. Gips og ettringit er meget ekspansive og ikke-understøttende materialer og vil dermed danne revner i og svække betonkonstruktionen [Li et al., 2017]. I korrosionslaget, fra biofilm på overfladen til det intakte beton, hersker der hermed en markant pH-gradient over ganske få mm.



Figur 2.5. Konceptuel visualisering af korrosionslagene i beton eksponeret for svovlsyre via biotisk sulfidoxidation af bakterieslægten *Acidithiobacillus*. Inspireret af Li et al. [2017].

Studier har påvist, at *A. thiooxidans* kan inhiberes ved hjælp af metaller såsom nikkel og tungsten, der binder sig til plasmamembranen og inhiberer specifikke enzymer, og dermed stopper væksten af cellen [Negishi et al., 2005; Nogami et al., 1997]. Begge tungmetaller er miljøfarlige og er underlagt Miljøbeskyttelsesloven, og kan derfor ikke bruges som bekæmpelsesmiddel. Desuden er det lykkedes at inhibere dem ved brug af biocidet tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfat (THPS), hvor stoffet ødelægger cellemembranen og de mikrobielle enzymer [Fytianos et al., 2021]. THPS er dog ikke en del af danske bekæmpelsesmiddeldatabase, og kan derfor heller ikke bruges som bekæmpelsesmiddel.

3. Materialer og metoder

For at undersøge effekten af forskellige stoffers påvirkning på den biotiske sulfidoxidation, er der udført en række laboratorieforsøg i en lukket bioreaktor tilsat ilt, sulfid, betonkorrosionsmateriale og forskellige stoffer med en mulig inhiberende effekt. I cyklusser er reaktoren blevet tilført ilt og sulfid, for at kunne monitorere bakteriel aktivitet i reaktoren over tid. Derudover er forskellige nitritkoncentrationer blevet undersøgt i et lukket brøndsystem. Gennem kontinuerlig måling af ilt- og svovlbrintekonzentration vil udviklingen over tid kunne bruges i vurderingen af teststofferne inhiberende effekt på *A. thiooxidans*. I følgende rapport benyttes betegnelsen *sulfid*, som det der tilsættes forsøgsreaktoren, mens *svovlbrinte* benyttes, når der snakkes om et forbrug. Betegnelsen *sulfidoxidation* dækker over oxidationen af svovlbrinte i forsøgsreaktoren. Kinetikken for den biotiske sulfidoxidation bliver angivet som forbrug af H_2S -S over tid.

3.1 Indhentning og behandling af korrosionsmateriale

Prøvemateriale blev afhentet hos Vandmiljø Randers den 3. marts 2025, hvor ca. 2 x 1 kg korrosionsmateriale blev udtaget fra to lokationer på et renseanlæg med stærkt korroderet beton; 1 kg fra et indløbsbygværk og 1 kg fra en kloakbrønd på vejen (Se figur 3.1). Materialet blev efterfølgende opbevaret i spande i et køleskab ved 5°C.



Indløbsbygværk



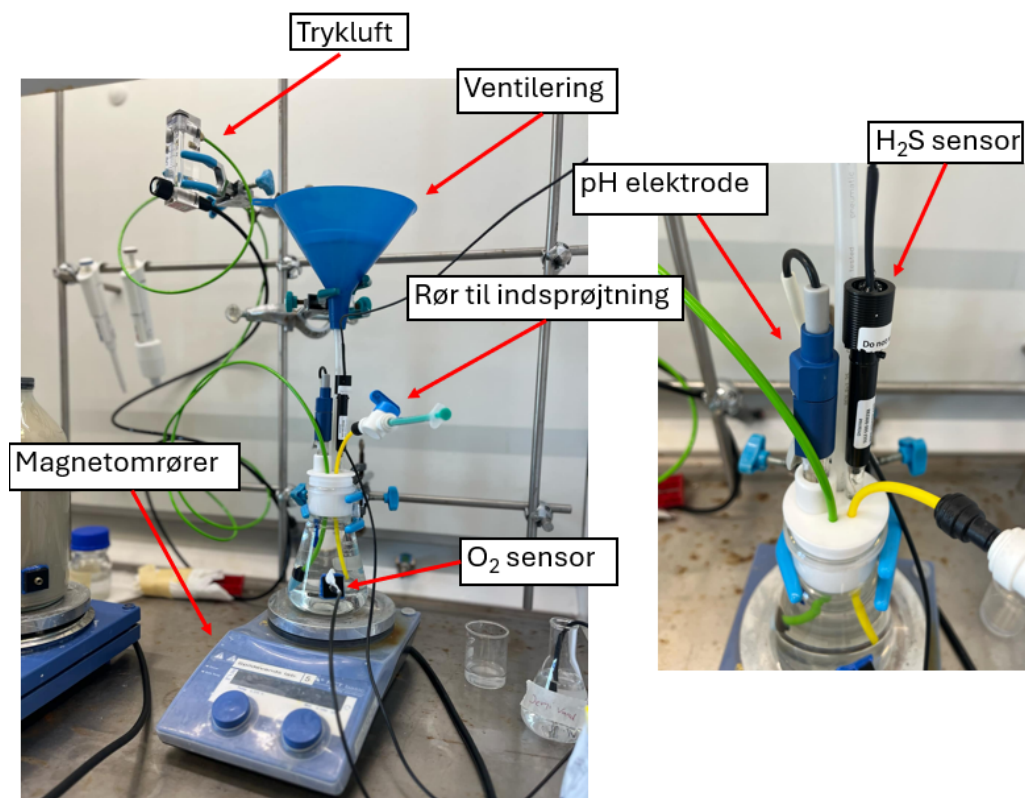
Kloakbrønd

Figur 3.1. Lokationer for indsamling af betonkorrosionsmateriale på Randers Centralrensningsanlæg.

Indledningsvis blev den mikrobielle aktivitet i korrosionsmaterialet testet ved at observere iltforbruget i en reaktor efter tilsætning af sulfid. Da aktiviteten ønskedes højere, blev en bakteriekultur forberedt ved at blande 500 mL vand med 300 g korrosionsmateriale i en 5 L plastikspand placeret på en magnetomrører (60 rpm). Kulturen blev kontinuerligt beluftet med en akvariepumpe, og pH blev justeret til ~2 med svovlsyre for at tilnærme en monokultur af arten *A. thiooxidans*. En doseringspumpe tilførte en konstant dosis sulfid på 1 mL i timen af en $5 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ stamopløsning. Hver fjerde dag blev 5 mL næringsstofopløsning tilsat, indeholdende; $20 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $100 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $40 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $1 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ og $1 \text{ g L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [Jensen, 2009]. Bakteriekulturen blev opretholdt gennem hele forsøgsperioden, og der blev tilsat vand og svovlsyre efter behov.

3.2 Forsøgsoptstillinger

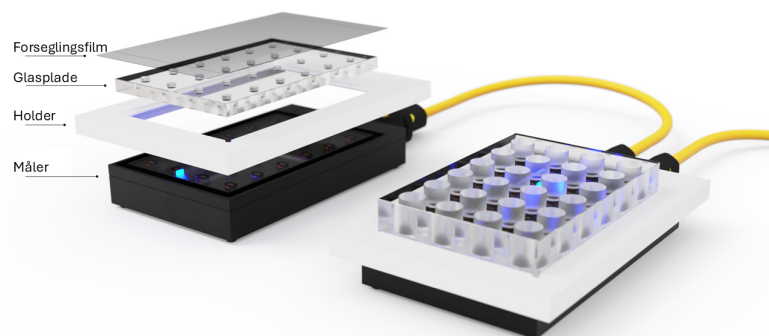
I kortlægningen af den biotiske sulfidoxidation, ved eksponering for forskellige teststoffer, blev der anvendt en lukket bioreaktor, for at bestemme ilt- og svovlbrinteforbruget, som indikator for bakteriernes aktivitet. Samtidig var det vigtigt, at reaktoren kunne beluftes uden at luftbobler akkumuleredes og geniltede væsken. Opstillingen, der blev anvendt til forsøgene, er illustreret på figur 3.2.



Figur 3.2. Forsøgsoptstilling af lukket bioreaktor til bestemmelse af biotisk sulfidoxidation.

Opstillingen blev placeret i et stinkskab på en magnetomrører (500 rpm) for at sikre en homogen blanding uden bundfald af betonmateriale. En teflonprop blev fremstillet til testkolben, hvori 5 huller af passende størrelse blev boret, så alle testremedier og sensorer kunne tilgå væsken. En ventil tilsluttet trykluft ledte via et grønt PE-rør luften gennem en boblesten ind i reaktoren, hvilket effektivt genilte vandet. For at minimere risikoen for utilsigtet geniltning blev der monteret et silikonerør med en blå tragt, som sikrede kontrolleret udluftning af overskydende luft i testkolben. Et gult PE-rør med en lukkeventil muliggjorde tilsætning af sulfid og teststoffer til væsken med en sprøjte under forsøgets forløb. Reaktoren blev desuden udstyret med sensorer til måling af pH, ilt og svovlbrinte, hvilket tillod løbende overvågning af systemets kemiske og biologiske processer. For at monitorere indholdet af svovlbrinte i reaktoren blev der brugt en H₂S Microsensor (SULF-50, Unisense, Danmark) monteret i proppen. Data blev logget af et Microsensor multimeter (Unisense, Danmark) med SensorTrace Suite software. Sensorsignalet blev omregnet til massekoncentration ved hjælp af en standardkurve med svovlbrintekonzentrationer bestemt jf. Cline [1969] plottet mod signalet målt fra sensoren. Indholdet af opløst ilt blev målt med en Optisk Oxygen Sensor (SP-PSt3-NAU-D5-NOP, PreSens, Tyskland) monteret på siden af reaktoren med forbindelse til et sensorspot påsat testkolbens inderside. Data blev logget af Minisensor Oxygen Meter (Fibox 3, PreSens, Tyskland). Iltkoncentrationen blev målt med temperaturkompensation, hvor det tilsluttede termometer løbende målte temperaturen i en lille kolbe ved siden af testkolben. Iltsensoren blev kalibreret i kolben efter to punkter med hhv. 100% iltmættet vand og iltfrit vand (0%) tilsat 20 g L⁻¹ Na₂SO₃ samt tilhørende forsøgstemperatur. pH i testkolben blev målt med en pH-sensor (Liq-Glass Knick®, Hamilton, USA) og monitoreret med et pH-meter (Lab 860, SI Analytics, Xylem, USA) for at sørge for at pH var omkring 2 under forsøgsperioden. En tre-punkts kalibrering af sensoren ved pH 4, 7 og 10, sikrede en præcis måling.

Til nærmere undersøgelse af udvalgte teststoffer, blev der brugt et 1.700 µL 24-brønd Microplate Respirometry System (Loligo Systems, Danmark). Pladen målte iltforbruget i 24 forseglet gastætte brønde i et lukket system med en optisk iltensor i bunden, som kan ses på figur 3.3. Data blev registreret på det dertilhørende MicroRespTM software. Pladen blev kalibreret efter samme metode som iltsensoren i ovenstående opstilling. Systemet havde en indbygget temperaturkompensation på ±1,5°C [Loligo Systems, 2025].



Figur 3.3. Opbygningen af brøndsystemet, der består af: en måler, en holder, en glasplade med brønde og forseglingsfilm [Loligo Systems, 2025].

3.3 Analytisk procedure

3.3.1 Udvælgelse af teststoffer

Aluminium og nitrit, der før har været undersøgt til korrosionsbeskyttelse ved tilsætning til cement brugt i beton, samt en bred vifte af biocider, der er registreret i den danske Bekæmpelsesmiddel-database, blev benyttet som teststoffer til undersøgelse af deres effekt på *A. thiooxidans*. Kriterierne for valg af biocid inkluderede, at det skulle være et baktericid, der har vist inaktiverende effekt på bakterier; det skal være svært opløseligt i vand (høj oktanol-vand fordelingskoefficient (LogK_{ow})), for at undgå udvaskning samt at sikre længerevarende beskyttelse; det skal være syrestabilt, for at sikre opretholdelse af dets effekt under de sure forhold på betonoverfladen; og afslutningsvis er det ønskværdigt, at det lokalt kan anvendes i en grad, der begrænser negative effekter på de bakterielle processer på det modtagende renseanlæg. De forskellige stoffer, der blev screenet i projektet, kan ses i tabel 3.1.

Tabel 3.1. Overblik over testede stoffer, deres molekyleformel, koncentration der blev brugt i screeningen samt deres oktanol-vand fordelingskoefficient (LogK_{ow}).

PCMC: 4-Chlor-3-methyl-phenol, IPBC: 3-Iodo-2-propynylbutylcarbamate, DDAC: Didecyldimethylammonium chlorid, DCOIT: 4,5-Dichlor-2-octyl-3-isothiazol.

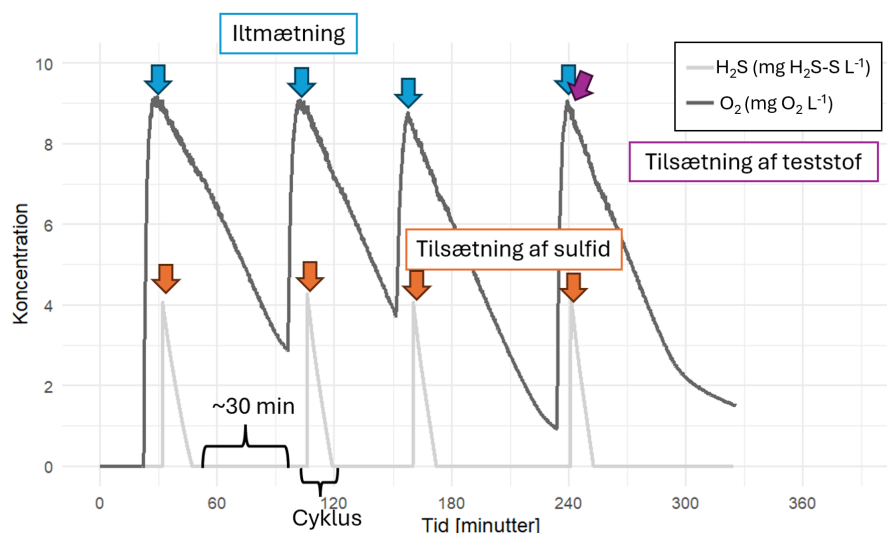
Navn	Molekylformel	Koncentration	$\text{Log}(K_{\text{ow}})$
Aluminumsulfat	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	3 g Al L^{-1}	-5,08*
Natriumnitrit	NaNO_2	5 mg NO_2^- -N L^{-1}	-3,7**
PCMC	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OHCH}_3\text{Cl}$	10 mg L^{-1}	3,1**
Benzoesyre	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	50 mg L^{-1}	1,87**
IPBC	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{INO}_2$	10 mg L^{-1}	2,4**
DDAC	$\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{ClN}$	1 mg L^{-1}	2,59**
Propiconazol	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$	5 mg L^{-1}	3,72**
DCOIT	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{NOS}$	1 mg L^{-1}	2,8 til 4,5**

*ECHA [2023] **National Center for Biotechnology Information [2025]

Testkoncentrationerne angivet i tabellen blev udvalgt ved at finde teststoffernes LC_{50} -værdier for forskellige testorganismer.

3.3.2 Screening af teststoffer

Gennem testperioden blev to testkolber anvendt med en vandmættet volumen på hhv. 310 mL og 620 mL. Ved hver forsøgsstart blev testkolben klargjort ved at skylle alle testremedier i vand og ethanol, hvorefter kolben blev delvist fyldt med vand og tilsat 9M svovlsyre for at opnå en pH på ~ 2. Herefter blev hhv. 50 og 100 mL korrosionsmateriale fra bakteriekulturen (Se afsnit 3.1) tilsat kolben, afhængigt af kolbestørrelsen. Proppen med alle testremedier blev smurt ind i vandskyende silikone og påsat kolben, hvorefter kolben blev fyldt op med vand gennem ventilen indtil vandstanden stod i ventileringsstragten. Væsken blev iltmættet med atmosfærisk trykluft, hvorefter overskydende luftbobler blev fjernet. Derefter blev en cyklus med kontinuerlig måling af ilt og svovlbrinte igangsat ved tilsætning af ~4,5 mg S L^{-1} fra en 5 g S L^{-1} $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ stamopløsning via ventilen. Koncentrationen af svovlbrinte og ilt blev løbende monitoreret, og hver ny cyklus blev initieret ved iltmætning og efterfølgende tilsætning af sulfid (jf. ovenstående procedure) med et interval på 30 minutter, efter at svovlbrinten fra den forrige cyklus var opbrugt. Ved undersøgelse af teststoffer blev dette tilsat efter iltning og inden tilsætning af sulfid, efter 2-3 referencecyklusser uden teststof. Dette er illustreret på figur 3.4.



Figur 3.4. Illustration af forsøgsforløbet, hvor tilsætning af hhv. sulfid, ilt og teststof er markeret med farvede pile.

3.3.3 Kemisk oxidation, diffusion og initialt iltforbrug

Følgende baggrundsfaktorer blev undersøgt for deres potentielle indvirkning på raten for den biotiske sulfidoxidation: det initiale iltforbrug af korrosionsmaterialet uden sulfid, kemisk oxidation af svovlbrinte med og uden autoklaveret korrosionsmateriale, svovlbrintediffusion ud af testkolben og kemisk reaktion mellem nitrit og svovlbrinte.

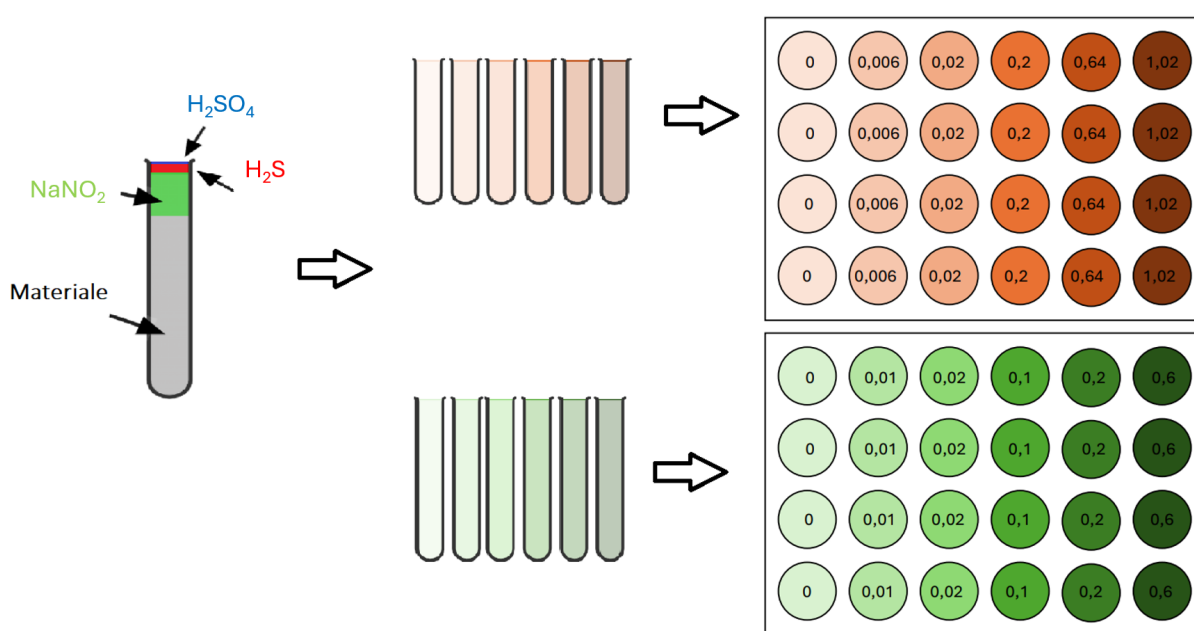
Et kombineret forsøg til at undersøge det initiale iltforbrug og den kemiske oxidation med korrosionsmateriale blev udført efter samme procedure som beskrevet i afsnit 3.3.2. Før første tilsætning af sulfid, blev det initiale iltforbrug målt ved at lade væsken stå i kolben og monitere iltforbruget som følge af biologisk respiration fra korrosionsmaterialet. Efterfølgende blev der igangsat to cyklusser af iltning og tilsætning af sulfid, før væsken i kolben blev autoklaveret i 40 minutter ved 120°C for at udrydde biologisk aktivitet [Jensen, 2009]. Dernæst blev en cyklus igangsat med det autoklaverede materiale.

Den kemiske oxidation uden korrosionsmateriale blev undersøgt ved samme procedure som beskrevet i afsnit 3.3.2. Her udgjorde én cyklus hele forsøget med løbende monitorering af svovlbrinte og ilt. Under dette forsøg blev faldet i svovlbrinte både et mål for den kemiske oxidation og diffusion ud af testkolben.

En potentiel reaktion mellem nitrit og svovlbrinte blev undersøgt ved at tilsætte nitrit svarende til testkoncentrationen til testkolben uden tilstedeværelse af korrosionsmateriale, for at udelukke bakteriel aktivitet. Dernæst blev sulfid tilsat i cyklusser, og svovlbrintekoncentrationen monitoreret.

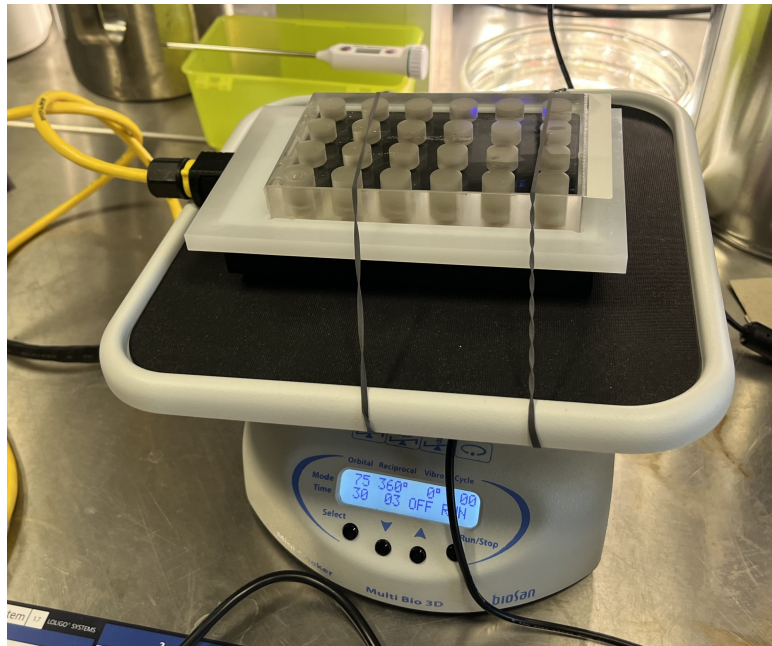
3.3.4 Eksponeringsanalyse af nitrit

I brøndsystemet blev effekten af forskellige nitrit-koncentrationer på sulfidoxidationen, målt i iltforbrug, undersøgt. Derudover blev effekten af 24 timers eksponering sammenlignet med den umiddelbare effekt af nitrit for forskellige koncentrationer. Forsøgene blev lavet af to omgange, og derfor blev nitritkoncentrationerne tilpasset for at kunne få et bredere spænd i effekt. De to intervaller af forsøgskoncentrationer spændte fra 0-1,02 og 0-0,6 mg $\text{NaNO}_2\text{-NL}^{-1}$ (Se figur 3.5). Korrosionsmateriale, nitrit, vand, sulfid og svovlsyre blev først blandet i 6 Greinerrør. Væskeforholdet var hhv. 78% korrosionsmateriale, 18% fortyndet NaNO_2 i forskellige koncentrationer, 3% sulfid svarende til $\sim 4 \text{ mgS L}^{-1}$ og 1% 0,29M svovlsyre for at sikre en pH på ~ 2 . Dette er også illustreret på figur 3.5.



Figur 3.5. Forsøgsprocedure til bestemmelse af kinetikken af biotisk sulfidoxidation målt i iltforbrug ved eksponering for nitrit ved brug af brøndsystemet. Tallene angivet på figuren er koncentration af nitrit tilføjet brøndene i $\text{mg NaNO}_2\text{-N L}^{-1}$.

Sulfid blev først tilsat greinerrørene lige inden forsøgets begyndelse. Greinerrøret blev omrystet med en vortex før det blev pipetteret over i en brønd-kolonne (4 replikater) tilsat en glaskugle (2,5-3,5 mm) for at sikre omrøring i forsøgsperioden. Brøndene blev forsejlet med en selvklæbende og gastæt polyesterfilm, for at sikre et lukket system uden geniltning. Filmen blev pårullet fra laveste koncentration mod højeste. Dernæst blev pladen påsat et rystebord (Multi Bio 3D, Biosan, Letland) og omrystet (75 rpm), for at undgå bundfældning af materialet. Pladen stod under omrystning i maksimum 6 timer, hvor iltkoncentrationen løbende blev logget (Se figur 3.6). Eftersom rystebordet afgav en smule varme, der påvirkede iltsensorens målinger, blev temperaturen løbende målt ved brug af en ekstern iltsensor (Fibox 3, PreSens, Tyskland).



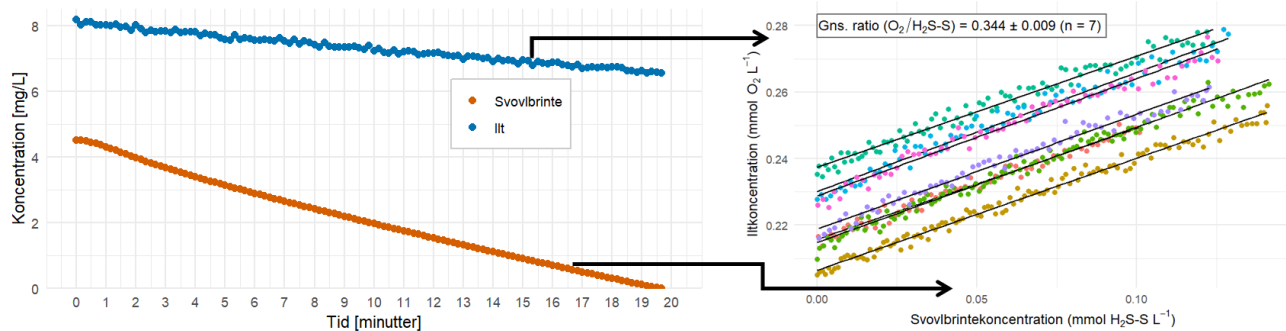
Figur 3.6. Igangværende forsøg med forseglet brøndsysteem på rystebord.

3.4 Databehandling

Alt tidsseriedata indhentet fra forsøgene blev importeret til og behandlet i R (RStudio, version 2024.12.1). Nedenstående giver et overblik over hvordan tidsseriedataen for de forskellige forsøg er behandlet, og hvordan figurerne præsenteret i kommende resultatafsnit er produceret.

3.4.1 Analyse af støkiometri

Til at analysere støkiometrien mellem sulfid og ilt i den biotiske sulfidoxidation, blev data fra syv forskellige forsøg analyseret. Den molære koncentration af ilt blev dernæst plottet som funktion af $\text{H}_2\text{S-S}$, hvorefter der for hvert forsøg blev udført lineær regression, som er illustreret på figur 3.7. Hældningskoefficienten for hver funktion blev tolket som det observerede iltforbrug pr. omsat mængde $\text{H}_2\text{S-S}$. Den gennemsnitlige støkiometriske ratio ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{S-S}$, $\pm\text{SD}$) blev dernæst fundet for de syv forsøg. Effekten fra diffusion og kemisk oxidation af ilt og svovlbrinte, samt geniltning af kolben blev negligeret i udregningen.



Figur 3.7. Metode til bestemmelse af støkiometrien mellem ilt og svovlbrinte i den biotisk sulfidoxidation.

Til at analysere støkiometrien for den kemiske reaktion mellem svovlbrinte og nitrit, blev et forsøg med $\sim 11 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$ og $5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ igangsat. Dernæst blev det støkiometriske forhold mellem de to reaktanter bestemt. Til at bestemme reaktionskinetikken og -ordenen blev en ratemodel sat op af typen:

$$\text{Rate} = -\frac{d[\text{H}_2\text{S}]}{dt} = k \cdot [\text{H}_2\text{S-S}]^m \cdot [\text{NO}_2^- \text{-N}]^n \quad (3.1)$$

Ved at lave et startgæt på modelparametrene k , m og n , samt at kende målte svovlbrintekonzentrationer over forsøgsperioden, start- og slutkoncentrationen af nitrit og det støkiometriske forhold mellem dem, kunne simulerede koncentrationer bestemmes. Ved hjælp af problemløseren i Excel kunne modelparametrene bestemmes ved mindste kvadraters metode mellem målte og simulerede svovlbrintekonzentrationer.

3.4.2 Analyse af sulfidoxideringsrater

For at visualisere effekten af de forskellige teststoffer på sulfidoxidationen, blev der foretaget en beregning af sulfidoxideringsraten, målt som faldet i $\text{H}_2\text{S-S}$ over tid. Dette muliggjorde en direkte sammenligning af referencecyklusser med cyklusser tilsat de respektive teststoffer for varierende eksponeringstid. De enkelte trin i analysen er visualiseret i figur 3.8 og uddybes i de næste underafsnit.

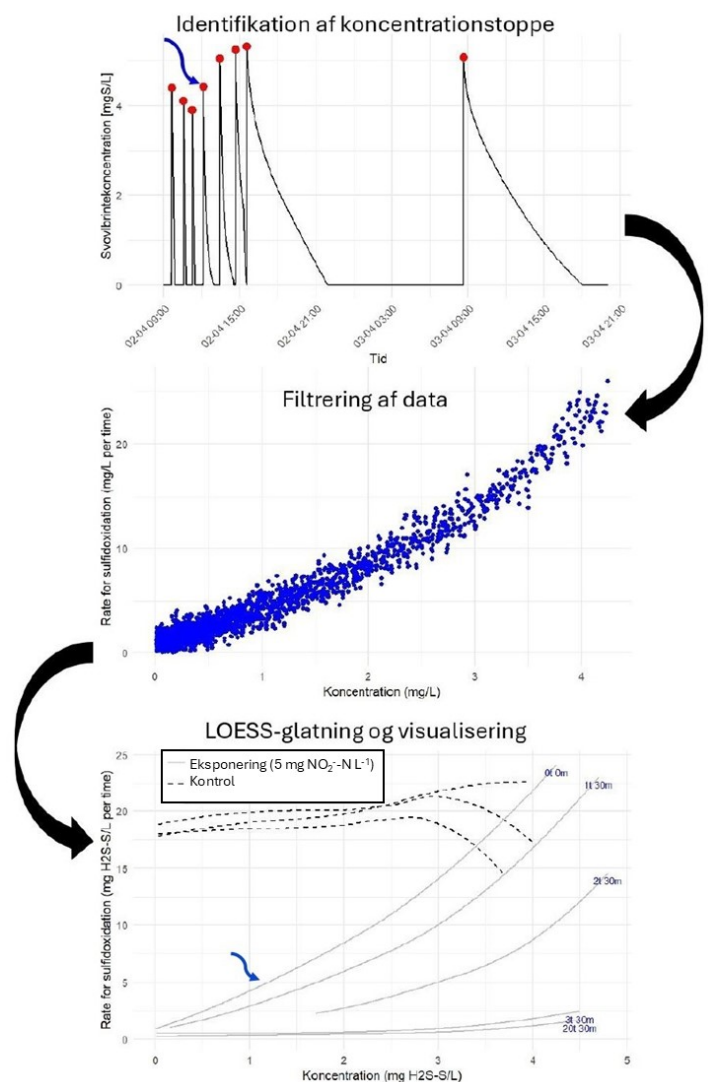
Identifikation af koncentrationstoppe

Da der blev udført flere cyklusser i hver tidsserie, var det vigtigt at kunne adskille disse. Dette blev gjort af en funktion, der identificerer lokale maksimumsværdier, der overstiger en defineret værdi ($> 2,5 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$), og som efterfølges af en markant nedgang i koncentration (defineret som 20% af koncentrationstoppen). Dermed kunne de lokale koncentrationstoppe, starten af hver cyklus, identificeres, og risikoen for at inkludere små eller støjrelaterede toppe undgås.

Filtrering af data

For alle identificerede cyklusser blev der foretaget et centreret glidende gennemsnit (centered rolling mean) på koncentrationens data. En dynamisk vinduesstørrelse (mellem 5 og 100 datapunkter - afhængigt af kinetikken) blev anvendt. Datapunkter med afvigende hastigheder blev filtreret fra vha. en standardafvigelsesbaseret outlier-detektion på ± 1 SD. For hver identificeret cyklus blev der desuden anvendt et individuelt koncentrationsinterval (koncentrationsfilter) til at afgrænse analysen til de relevante dele af cyklussen. Dette blev gjort for at udelukke støj, eksempelvis fra berøring af kolben eller tidlig afbrydelse af forsøget. Koncentrationsintervallet blev bestemt manuelt ved visualisering af dataen. Dernæst blev der beregnet en rate mellem hvert rullende gennemsnit efter formelen:

$$Rate = \frac{\Delta[H_2S-S]}{\Delta t}$$



Figur 3.8. Illustration af de forskellige processer for databehandling til bestemmelse af raten for den biotiske sulfidoxidation. Den blå pil viser hvilken cyklus, der er illustreret.

Således blev der opnået rater for svovlbrinteforbruget fra cyklusstart til cyklusafslutning, hvor udviklingen af rate som funktion af svovlbrintekonzentrationen kunne blive afbilledet.

Visualisering

For hver cyklus blev sammenhængen mellem koncentration og oxidationsrate visualiseret. Der blev anvendt LOESS-glatning (Locally Estimated Scatterplot Smoothing) til at fremstille mere kontinuerte kurver mellem datapunkterne og visualisere det som en linje, der repræsenterer den lokale tendens, i

stedet for at låse data op på en bestemt funktionsform (f.eks. lineær, eksponentiel udvikling). Referencecyklusserne uden eksponering for teststof kunne hermed visualiseres sammen med cyklusserne eksponeret for teststof i en samlet figur, hvor også eksponeringstiden fremgik for testcyklusserne.

3.4.3 Analyse af kemisk oxidation, diffusion og initialt iltforbrug

Analysen af det initiale iltforbrug og kemisk sulfidoxidation blev udført efter samme metode som beskrevet i ovenstående afsnit 3.4.2. Da reaktionerne forløb langsomt, blev analysen begrænset til de første 30 timer af forsøget. På baggrund af antagelsen om 0. ordens kinetik blev der anvendt lineær regression til at estimere reaktionsraten.

3.4.4 Eksponeringsanalyse af nitrit

Datasættene for eksponering med nitrit i 0 timer og 24 timer blev kombineret. Middelværdien for hver eksponeringstid (0t og 24t) og koncentration blev beregnet for 2-4 replikater. Disse blev afbildet i separate kurver ($\pm$ SD) som udvikling i iltmætning over tid. Enkelte replikater blev sorteret fra grundet luftbobler i brøndene.

For to udvalgte datasæt blev iltmætningen udtrukket ved forsøgsstart og efter ca. 30 minutter til måling af *A. thiooxidans* respons. Respons (%) angiver i hvor høj grad bakteriernes iltforbrug er inhiberet efter 30 min ($O_2\%$ efter 30 min), som følge af eksponering til en respektiv koncentration af nitrit, sammenlignet med en referenceværdi ($O_2\%$ efter 30 min) uden nitrit. Responsen blev normaliseret, som angivet i ligning 3.2, ved at tage forskellen mellem iltmætningen for den respektive brønd efter 30 min og reference iltmætningen efter 30 min i forhold til forskellen i iltmætning ved start for den respektive brønd og referencebrøndens iltmætning efter 30 min.

$$Respons(\%) = \frac{O_2^{30min} - O_2^{ref}}{O_2^{start} - O_2^{ref}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Hvor:

O_2^{30min}	Iltmætning af brønd efter 30 min [% O_2]
O_2^{start}	Iltmætning af brønd ved forsøgsstart [% O_2]
O_2^{ref}	Reference iltmætning efter 30 min [% O_2]

Dernæst blev gennemsnittet af responsen ($\pm$ SD) for hver koncentration beregnet for de to datasæt og plottet som funktion af nitritkoncentration. Slutteligt blev datapunkterne fra de to datasæt fittet til følgende logistiske model:

$$Respons(\%)_{gns} = R_{maks} + \frac{R_{min} - R_{maks}}{R_{min} + \left(\frac{[NO_2^- - N]}{EC_{50}} \right)^b} \quad (3.3)$$

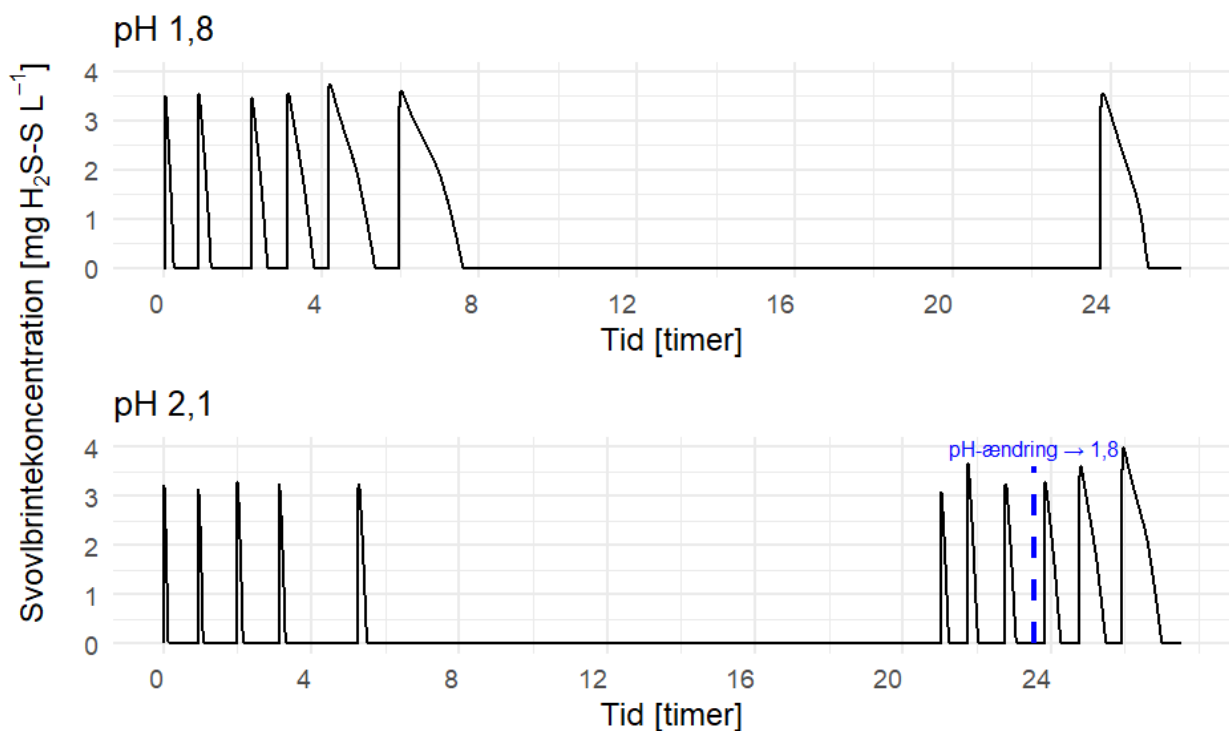
Hvor:

$Respons(\%)_{gns}$	Gennemsnitlig respons [%]
$NO_2^- - N$	Nitritkoncentration [mg $NO_2^- - N$ L ⁻¹]
R_{min}	Respons ved lav dosis (min respons) [%]
R_{maks}	Respons ved høj dosis (max respons) [%]
EC_{50}	Koncentration hvor halvdelen af respons opnåes [mg $NO_2^- - N$ L ⁻¹]
b	Hældning [-]

4. Resultater

4.1 Effekt af pH

Under forsøgene blev der observeret et fald i raten for sulfidoxidation for referencecyklusserne over tid. Figur 4.1 viser to separate forsøg; et med en start-pH på 1,8 svarende til den normale forsøgsprocedure, og et med en start-pH på 2,1 svarende til den målte pH i bakteriekulturen, med et efterfølgende skift i pH til 1,8. Cyklusserne giver et indblik i udviklingen for svovlbrinteforbruget over tid.

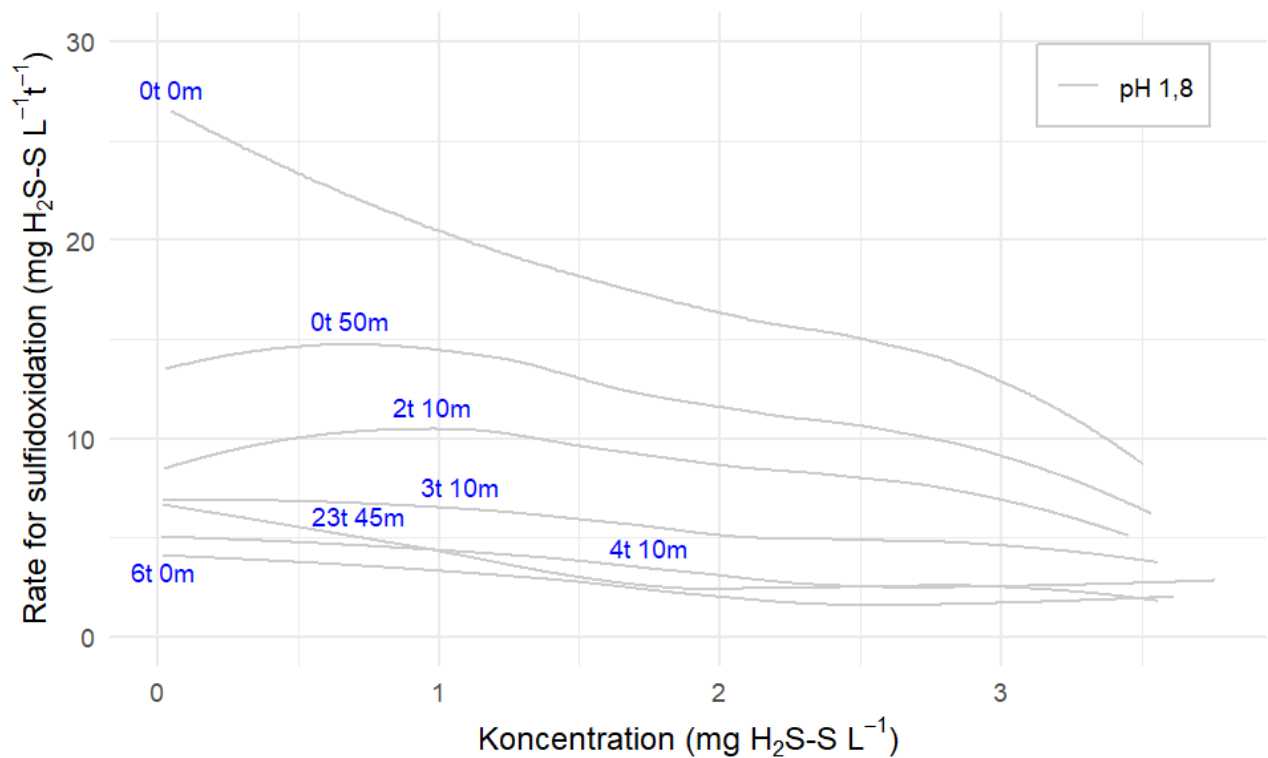


Figur 4.1. Effekt af lavere pH på aktiviteten af *A. thiooxidans*. Den stiplede blå linje indikerer tidspunktet for pH-ændring under andet forsøg.

På øvre graf øges tiden for komplet svovlbrinteforbrug gradvist for hver cyklus, hvor *A. thiooxidans* er udsat for en pH på 1,8. Det synes yderligere, at svovlbrinteoptaget efter 24 timer er hurtigere end ved forrige cyklus, hvilket kunne antyde en tilpasning til det surere miljø. Ved nedre graf, hvor *A. thiooxidans* er udsat for en pH på 2,1, ses intet tydeligt fald i optag igennem testcyklusserne, mens en tydelig effekt ses, når pH pludselig sænkes til 1,8. For de tre sidste cyklusser øges tiden for komplet svovlbrinteforbrug sammenlignet med de forhenværende 8 cyklusser.

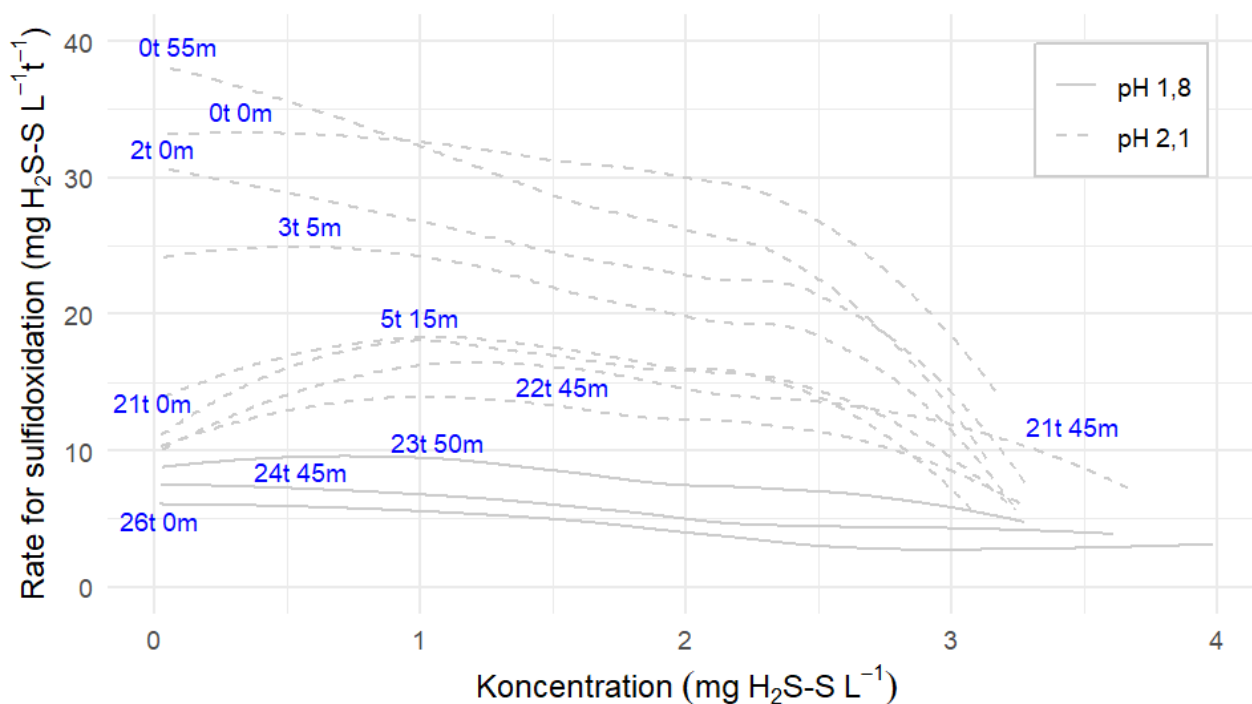
Figur 4.2 og 4.3 viser rateudviklingen for svovlbrinteforbruget for hver cyklus over de to forsøg

illustreret på figur 4.1.



Figur 4.2. Udvikling i rate for svovlbrinteforbruget igennem forsøgsperioderne illustreret på figur 4.1. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra forsøgets start. De fulde grå linjer er cyklusser med pH 1,8.

På figur 4.2 ses der et stort fald i raten for svovlbrinteforbruget fra første cyklus til næste cyklus. Tendensen fortsætter, hvor raten falder gradvist for hver cyklus indtil den stabiliserer sig omkring 4-6 timer.



Figur 4.3. Udvikling i rate for svovlbrinte-forbrug igennem forsøgsperioderne illustreret på figur 4.1. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra forsøgets start. De fulde grå linjer er cyklusser med pH 1,8 og de stiplede grå er cyklusser med pH 2,1.

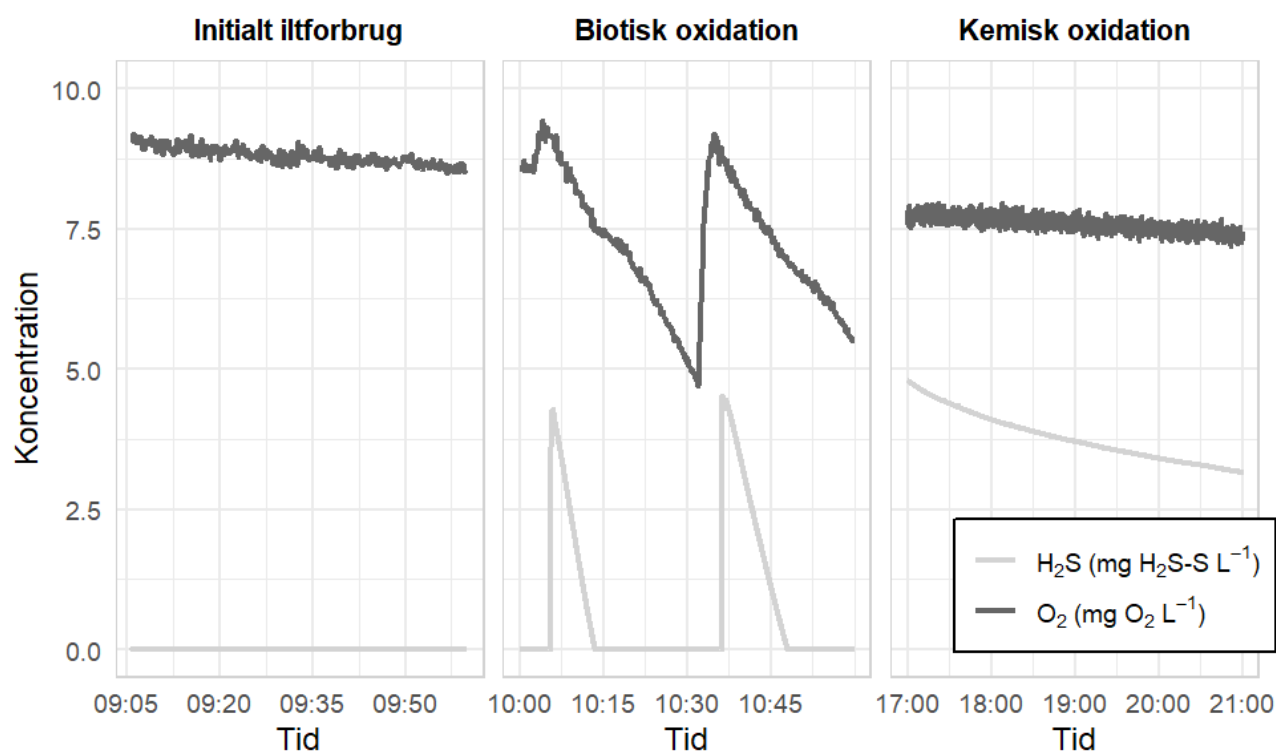
På figur 4.3 ses også et fald i raten for sulfidoxidation ved en pH på 2,1, dog ikke så hurtigt som på figur 4.2. Her holder raten sig forholdsvis højt i løbet af de 4 første cyklusser. Og der synes ingen betydelig effekt fra cyklusserne, 5 timer og 15 minutter til cyklusserne 21 timer fra forsøgsstart. Efter ændringen i pH ses et større fald i cyklussernes rateforløb, taget tiden i betragtning, sammenlignet med cyklusserne forinden.

Denne observation, vedrørende effekten af pH-ændring, kan bruges til at vurdere teststofferne reelle inhiberingseffekt på sulfidoxidationen, som præsenteres i afsnit 4.4.

4.2 Baggrundsforbrug af ilt og svovlbrinte

Under analysen af den biotiske sulfidoxidation ønskedes det at kende baggrundsforbruget af ilt og svovlbrinte, som resultat af kemisk oxidation og initialt iltforbrug, for at kunne isolere det bakteriedrevne forbrug.

På figur 4.4 ses et forsøg med monitoring af ilt og svovlbrinte, hvor først det initiale iltforbrug uden svovlbrinte, den biotiske oxidation med svovlbrinte og den kemiske oxidation efter autoklavering af korrosionsmateriale kan ses som funktion af tid.



Figur 4.4. Bestemmelse af ilt og svovlbrinteforbruget under tre forskellige forhold; Initialt iltforbrug af korrosionsmateriale uden svovlbrinte, biotiske sulfidoxidation og kemiske oxidation med autoklaveret korrosionsmateriale. Koncentrationen af svovlbrinte (lysegrå) og ilt (mørkegrå), for de tre forhold, er angivet over forskellige tidsintervaller.

Det kan ses, at der er et initialt iltforbrug fra *A. thiooxidans* på trods af, at der ingen svovlbrinte er til stede i forsøgskolben. Efter dette blev svovlbrinte og ilt tilsat kolben i to cyklusser, og der ses et hurtigt forbrug af både ilt og svovlbrinte. Den efterfølgende kemiske oxidation med autoklaveret materiale, viser et fortsat forbrug, dog markant lavere end ved den biotiske oxidation.

Foruden denne bestemmelse af den kemiske oxidation blev svovlbrinte monitoreret i kolben uden tilsat korrosionsmateriale for at bestemme diffusion og forbrug. I tabel 4.1 er baggrundsforbruget angivet som raten for svovlbrinte- og iltforbrug. Disse rater inkluderer både diffusion af svovlbrinte ud af testkolben og geniltning af kolben. Det ses, at det kemiske optag af svovlbrinte med autoklaveret materiale er tre gange højere end uden korrosionsmateriale.

Tabel 4.1. Raten for den kemiske baggrundsoxidation og diffusion af svovlbrinte med og uden korrosionsmateriale, samt raten for det initiale iltforbrug.

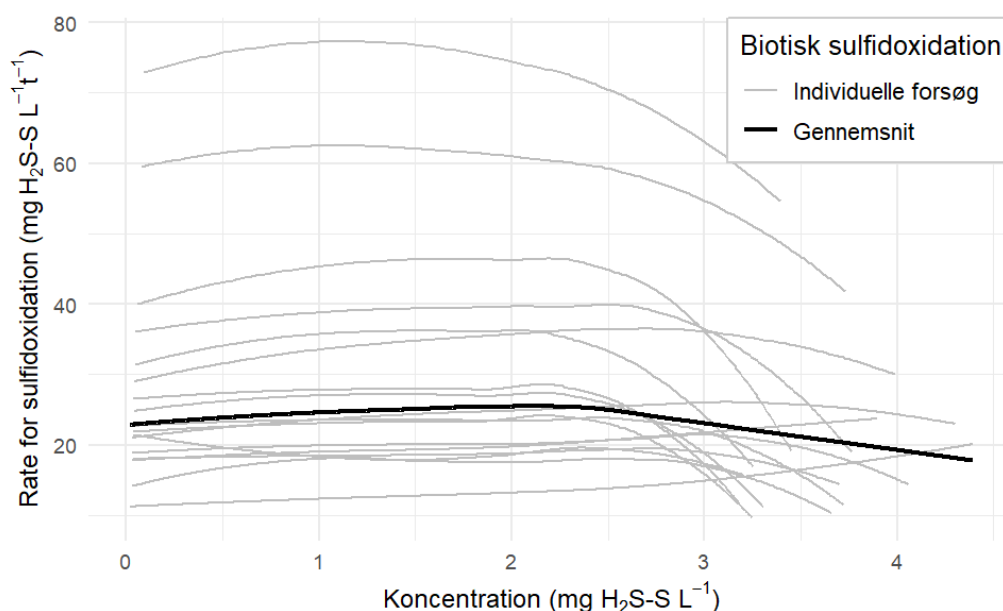
Sulfidoxidation (kemisk)	Sulfidoxidation (autoklaveret)	Initialt iltforbrug
$0,062 \pm 0,007 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}\text{t}^{-1}$	$0,18 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}\text{t}^{-1}$	$0,023 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}\text{t}^{-1}$

Som det kan ses på figur 4.4 er raten for biotisk sulfidoxidation langt større end værdierne i tabellen, derfor er påvirkningen fra baggrundsforbruget på det biotiske forbrug ganske lille, hvilket også blev

påvist af Jensen [2009]. Derfor vil der ikke blive taget højde for den kemiske baggrundsoxidation samt diffusion i sulfidoxideringsraterne i den videre analyse.

4.3 Kinetik og støkiometri ved biotisk sulfidoxidation

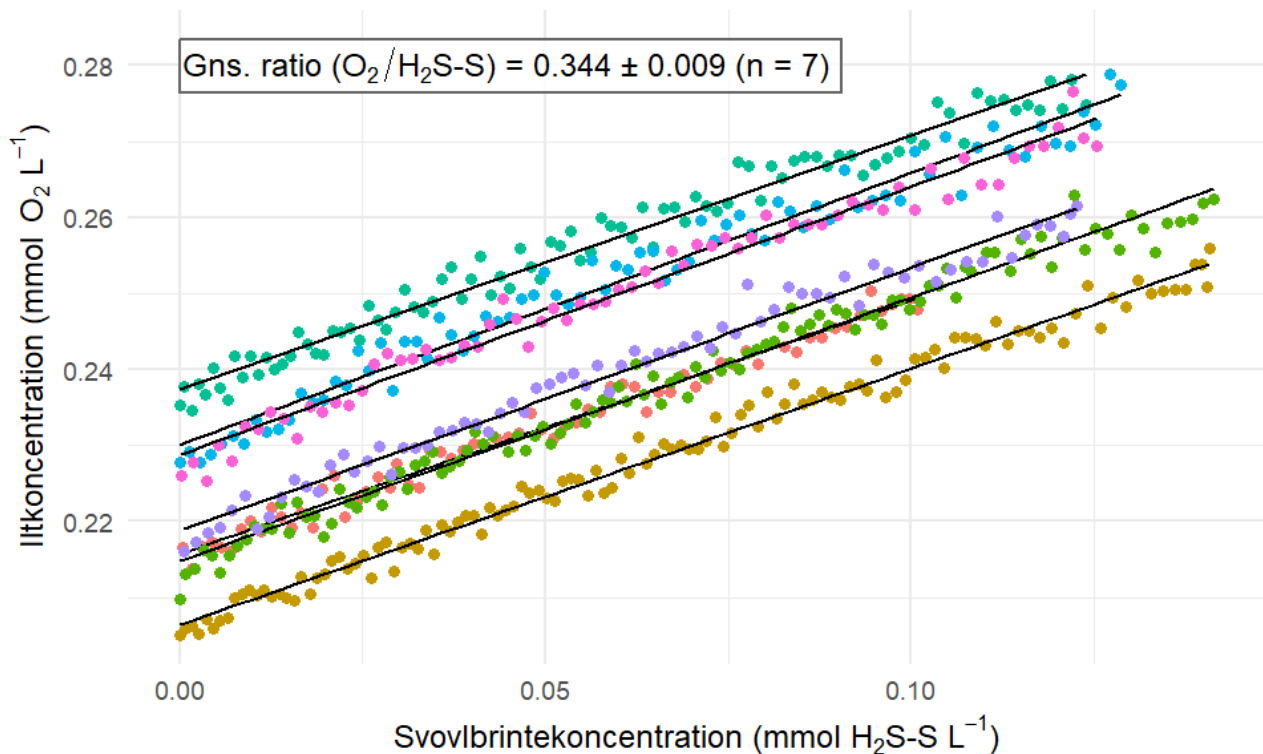
På figur 4.5 ses rateudviklingen for den biotiske sulfidoxidation for individuelle forsøg som funktion af svovlbrintekonzentrationen. Der ses en stor variation i raten fra forsøg til forsøg, hvilket kan begrundes med varierende koncentrationer af bakterier i den udtagne volumen fra bakteriekulturen. Derfor blev der foretaget forsøgsspecifikke referencecyklusser, så effekten af teststof på raten kunne sammenlignes med en referencerate specifik for den enkelte koncentration af bakterier benyttet i forsøget. Gennemsnitsraten for den biotiske sulfidoxidation ligger fra 18-25 mg $\text{H}_2\text{S-S L}^{-1}\text{t}^{-1}$, og effekten fra kemisk oxidation og diffusion er derfor $<1\%$.



Figur 4.5. Udvikling i rate for biotisk sulfidoxidation for alle referencecyklusser foretaget ved analyse af hvert teststof. De fulde grå linjer er forsøgscyklusser fra individuelle forsøg. Den fulde sorte linje er gennemsnittet.

Støkiometrien i reaktionen mellem svovlbrinte og ilt blev ydermere undersøgt. På figur 4.4, angivet i sektion 4.2, ses der på midterste graf et simultant optag af ilt og svovlbrinte. Det skal bemærkes, at iltkonzentrationen fortsat falder efter, at svovlbrinten er opbrugt, hvilket kunne antyde en udnyttelse af et svovl-mellemprodukt i oxidationen. Et lille knæk i iltoptaget kan ses, når koncentrationen af svovlbrinte rammer nul. Efter et par minutter fortsætter optaget i samme hastighed som med svovlbrinte til rådighed. Dette kan betyde, at *A. thiooxidans* metabolisme ændres til at kunne udnytte en reduceret svovlforbindelse som elektrondonor. Ved at plotte koncentrationen af ilt som funktion af koncentrationen af svovlbrinte under den biotiske sulfidoxidation indtil svovlbrintekonzentrationen

rammer nul, kan det støkiometriske forhold imellem de to reaktanter findes som hældningen af den lineære sammenhæng. Dette kan ses på figur 4.6.



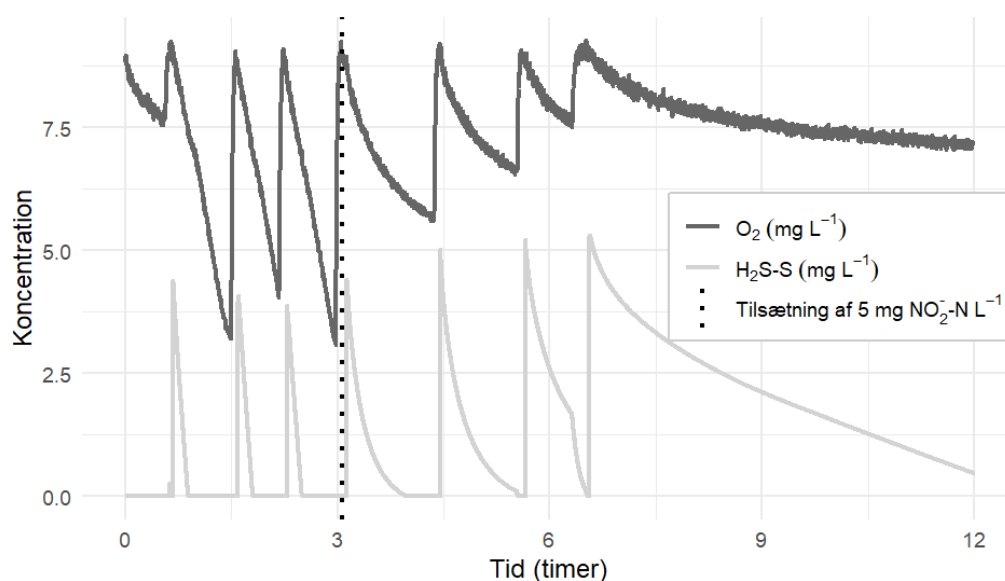
Figur 4.6. Støkiometrisk forhold imellem ilt og svovlbrinte under biotisk sulfidoxidation. Hvert sæt datapunkter repræsenterer et individuelt forsøg, hvor ratioen er beregnet som hældningskoefficienten for hver af de syv gentagelser. Den gennemsnitlige ratio ($\pm$ SD) fremgår i tekstboksen i toppen af figuren.

Det ses, at sammenhængen er lineær for hver gentagelse. Den gennemsnitlige ratio ligger på 0,344 mol O_2 /mol H_2S , som er forskellig fra den teoretiske værdi på 0,5 mol O_2 /mol H_2S . Dette vil blive uddybet i sektion 5.4.

4.4 Effekt af udvalgte teststoffer

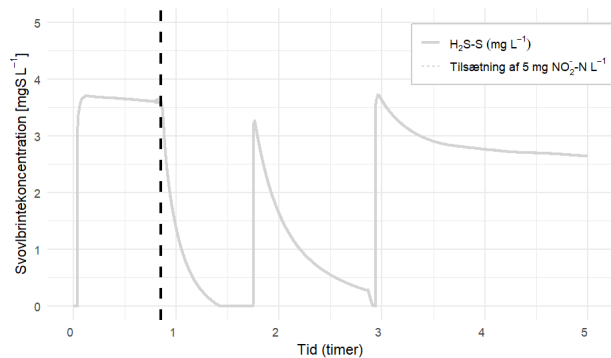
Eftersom nitrit og aluminium allerede er undersøgt i beton for bedre korrosionsbeskyttelse, blev deres påvirkning på *A. thiooxidans* indledningsvis undersøgt.

På figur 4.7 ses effekten af 5 mg NO_2^- -N L^{-1} på den biotiske sulfidoxidation, hvor ilt- og svovlbrintekonzentrationen er angivet over tid. De første cyklusser fungerer som reference inden tilsætning af nitrit, som er markeret med den stiplede linje. Det ses, at faldet i svovlbrinte- og iltkonzentration ændrer karakter fra at være lineært aftagende til eksponentielt aftagende, og at forbruget generelt aftager over tid efter tilsætning af nitrit. Dette indikerer, at nitrit har en inhiberende effekt på *A. thiooxidans*.

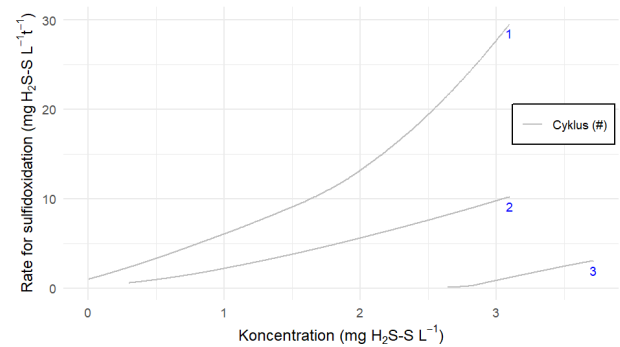


Figur 4.7. Udvikling i ilt- (mørkegrå streg) og svovlbrintekonzentrationen (lysegrå streg) over tid efter eksponering med nitrit. Den stiplede sorte linje viser tidspunktet for tilsætning af 5 mg $\text{NO}_2^- \text{N L}^{-1}$.

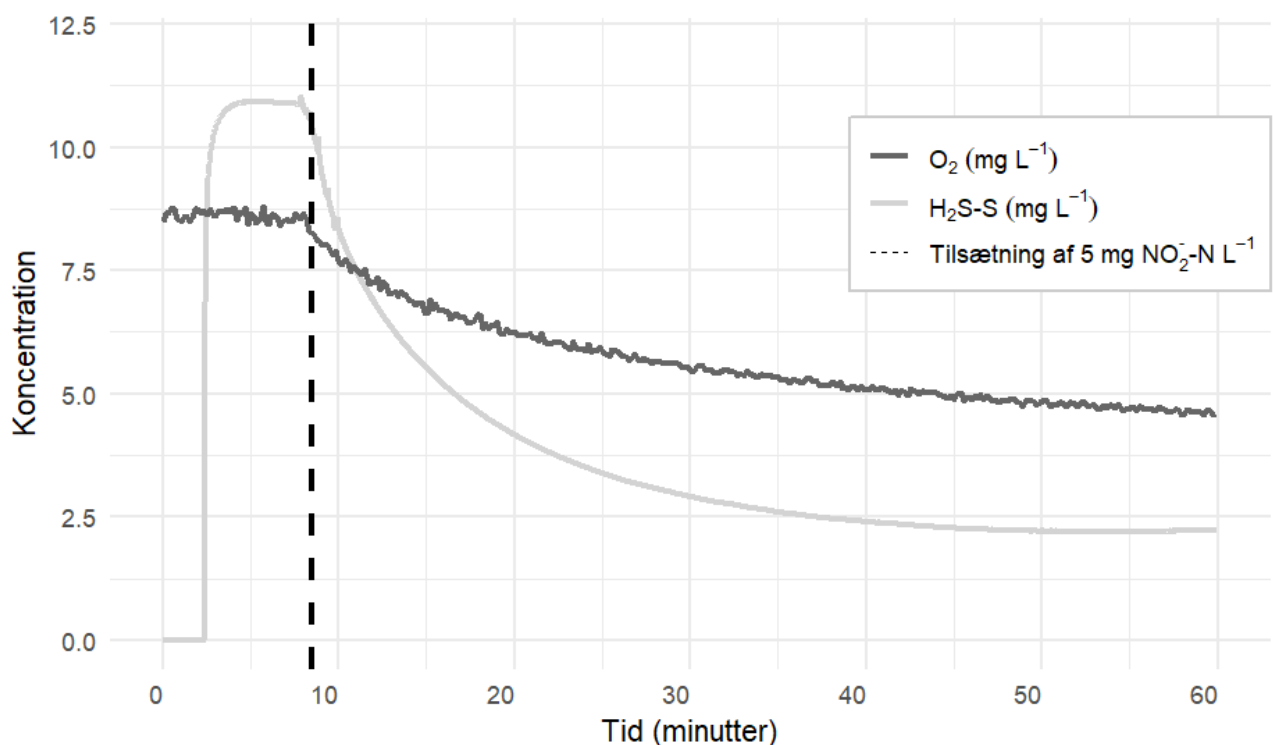
Reaktionen mellem nitrit og svovlbrinte blev undersøgt under abiotiske forhold ved to forskellige startkoncentrationer af svovlbrinte, hvilket kan ses på figur 4.8 og 4.10. Under forsøget, der kan ses på figur 4.8, blev der tilsat sulfid af tre omgange. Tilhørende udvikling i raten for sulfidoxidationen kan ses på figur 4.9. Svovlbrinteforbruget i den kemiske oxidation kan minde om forbruget i den biotiske oxidation, der er angivet på figur 4.7. Men eftersom forbruget ikke stagnerer efter tredje cyklus for den biotiske oxidation, som det var set ved den kemiske, kan der fortsat antages mikrobiel aktivitet. Dog vurderes det, at den kemiske oxidation fortsat har en stor indflydelse på resultaterne for den biotiske sulfidoxidation. Ved forsøget, der ses på figur 4.10, blev der tilsat sulfid én gang. Det ses i begge tilfælde, at svovlbrintekonzentrationen aftager eksponentielt under tilstedeværelse af nitrit, hvorefter svovlbrintekonzentrationen stagnerer, når nitrit er opbrugt. Ydermere kan det ses på figur 4.10 at iltkoncentrationen også falder efter tilsætning af nitrit.



Figur 4.8. Udvikling i svovlbrintekonsentrationen (lysegrå streg) efter tilsætning 5 mg $\text{NO}_2^- \text{N L}^{-1}$ som følge af kemisk reaktion mellem nitrit og svovlbrinte. Svovlbrinte er tilsat i tre cyklusser. Den stiplede sorte linje angiver tidspunktet for tilsætning af nitrit.



Figur 4.9. Udvikling i rate for svovlbrinteoxidation ved kemisk reaktion mellem svovlbrinte og nitrit efter tilsætning af 5 mg $\text{NO}_2^- \text{N L}^{-1}$. De fulde grå linjer er forsøgscyklusser angivet med cyklusnummer, hvor første cyklus svarer til første cyklus set på venstre billede.



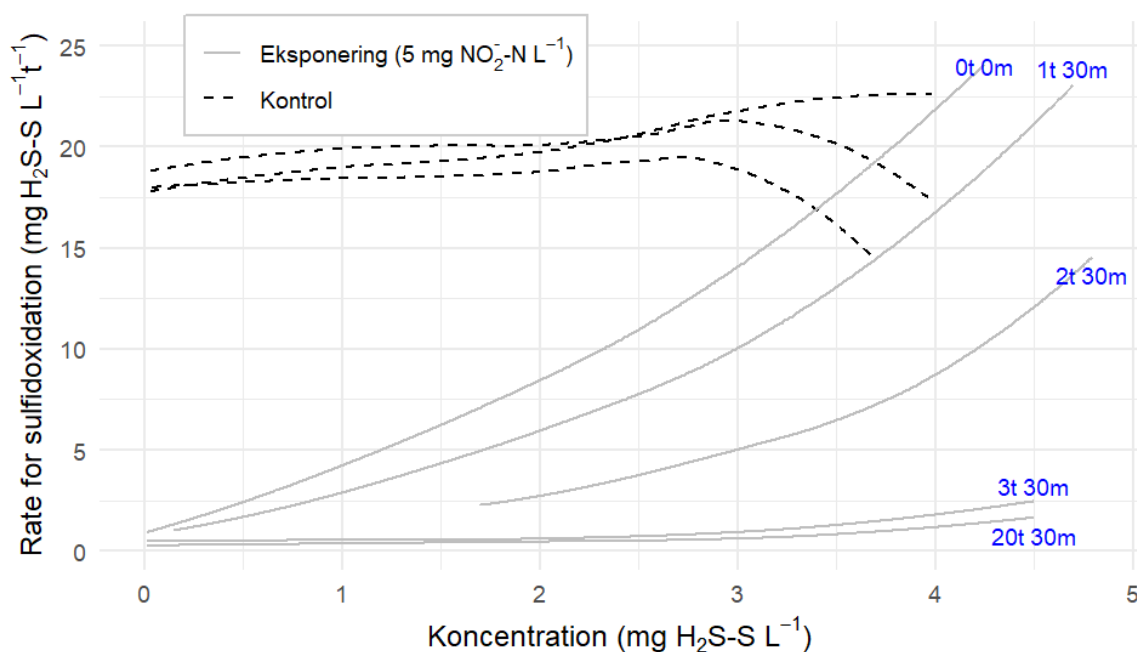
Figur 4.10. Udvikling i ilt- (mørkegrå streg) og svovlbrintekonsentrationen (lysegrå streg) over tid efter tilsætning af 5 mg $\text{NO}_2^- \text{N L}^{-1}$ som følge af abiotiske reaktioner. Svovlbrinte er tilsat i en cyklus. Den stiplede sorte linje angiver tidspunktet for tilsætning af nitrit.

Ud fra forsøget afbildet på figur 4.10 er rateloven for reaktionen bestemt til at være:

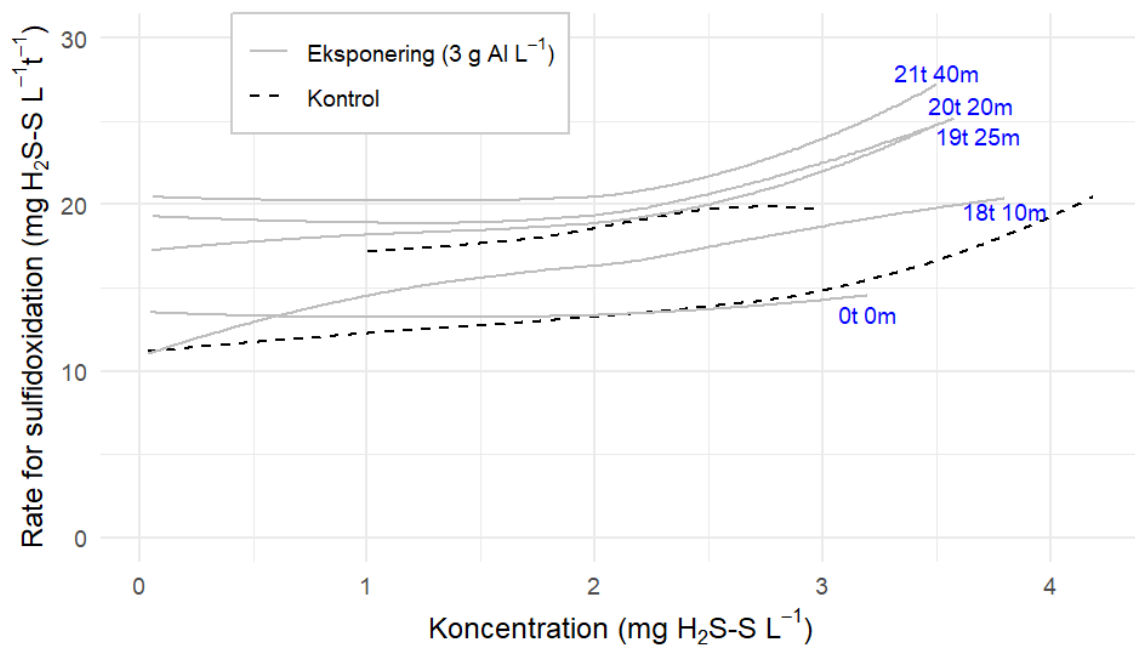
$$\text{Rate (mg H}_2\text{S L}^{-1} \text{ t}^{-1}) = -\frac{d[\text{H}_2\text{S}]}{dt} = 0,375 \cdot [\text{H}_2\text{S-S}]^2 \cdot [\text{NO}_2^- \text{N}]^{0,2} \quad (4.1)$$

Ud fra eksponenterne er reaktionen samlet set en 2,2-ordens reaktion, hvor de enkelte eksponenter antyder, at raten mest er afhængig af svovlbrintekonzentrationen, hvilket indikerer en mere indirekte påvirkning af nitrit.

Figur 4.11 viser sulfidoxideringsraten for forskellige cyklusser ved tilsætning af nitrit som resultat af forskellige eksponeringstider. Det fremgår, at referenceraterne er forholdsvis ensartede. Efter tilsætning af nitrit ses imidlertid et fald i oxideringsraterne, og raten bliver afhængig af svovlbrintekonzentrationen. Desuden ses det, at en længere eksponeringstid forårsager en lavere oxideringsrate, hvilket indikerer en inhiberende effekt af nitrit på *A. thiooxidans* ved en koncentration på $5 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1}$. Forløbet kan minde om den abiotiske reaktion mellem nitrit og svovlbrinte, som vist på figur 4.9.



Figur 4.11. Udvikling i rate for svovlbrinteoxidation efter tilsætning af $5 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1}$. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra tilsætning af nitrit. De stiplede sorte linjer er raten for referencecyklusserne (inden tilsætning af nitrit) og de fulde grå linjer er raten for cyklusser efter tilsætning af nitrit.

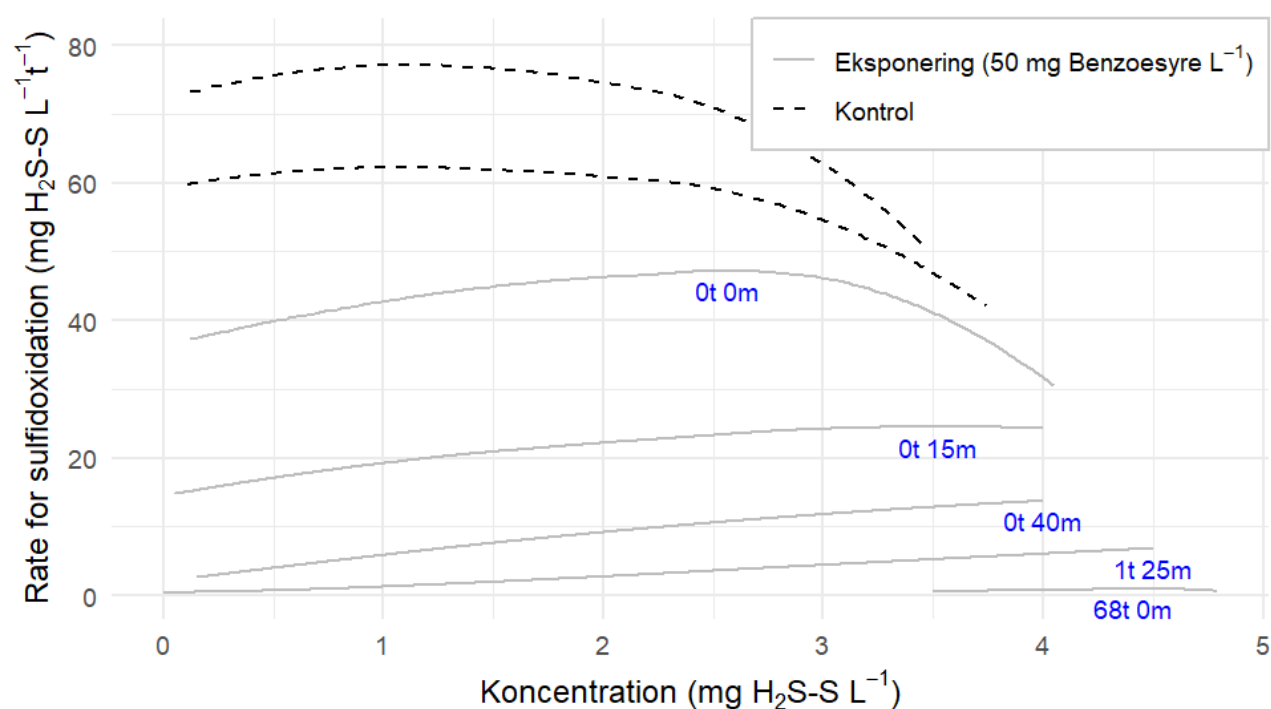


Figur 4.12. Udvikling i rate for svovlbrinteoxidation efter tilsætning af 3 g Al L⁻¹. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra tilsætning af aluminium. De stiplede sorte linjer er raten for referencecyklusserne (inden tilsætning af aluminium) og de fulde grå linjer er raten for cyklusser efter tilsætning af aluminium.

Effekten af aluminium på sulfidoxidationen ses på figur 4.12. Her ligger raten for referencecyklusserne inden for et bredere spænd sammenlignet med nitritforsøget. Efter tilsætning af aluminium stiger oxidationsraten, og stigningen tiltager med øget eksponeringstid. Dette tyder på, at aluminium ikke har en hæmmende virkning på sulfidoxidationen, og dermed ikke inhiberer *A. thiooxidans* ved en koncentration på 3 g Al L⁻¹.

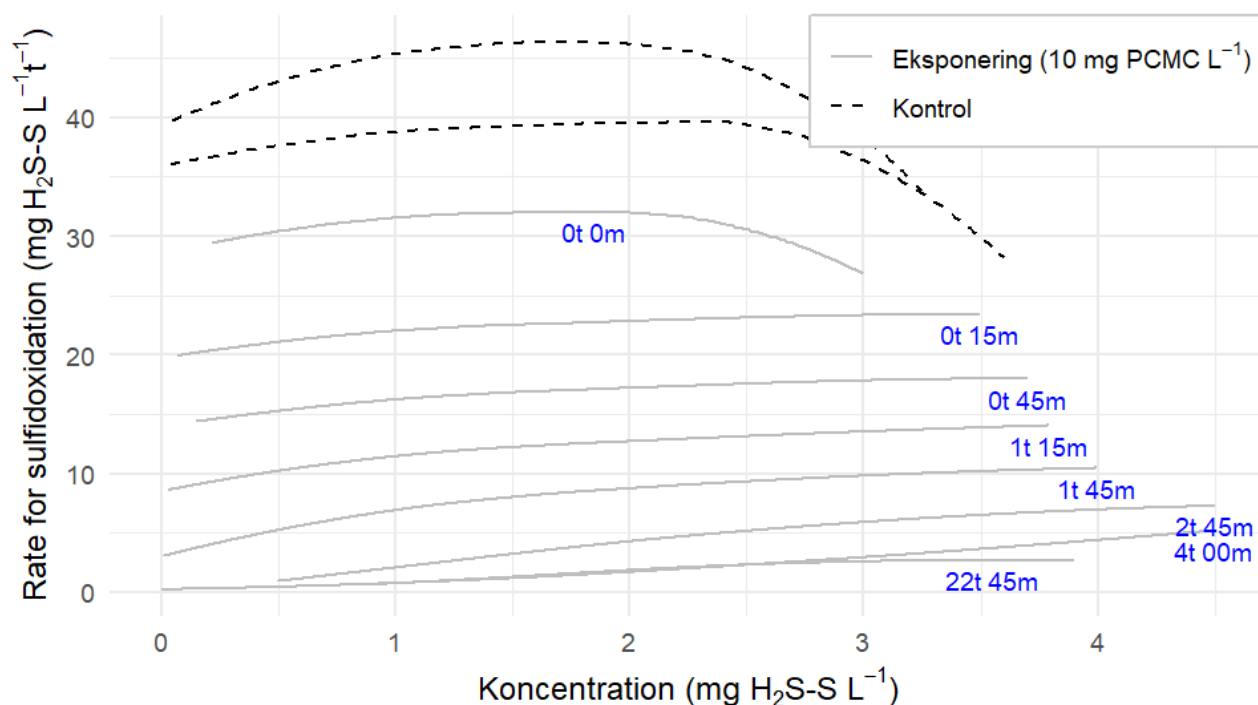
Eftersom de allerede undersøgte teststoffer, nitrit og aluminium, viste varierende effekt på *A. thiooxidans*, blev effekten af forskellige biocider ligeledes undersøgt.

Figur 4.13 viser effekten af benzoesyre på sulfidoxidationen. Raten for referencecyklusserne var de højeste, der blev målt i hele forsøgsperioden. Efter tilsætning af benzoesyre ses et markant fald i oxidationsraten ved de første to testcyklusser, og for de efterfølgende cyklusser falder raterne en del indtil der efter 68 timer nærmest ingen aktivitet er. Dette kan indikere, at oxidationen herefter udelukkende er kemisk og ikke biotisk. Det tyder derfor på, at benzoesyre ved en koncentration på 50 mg L⁻¹ er inhiberende for *A. thiooxidans*.



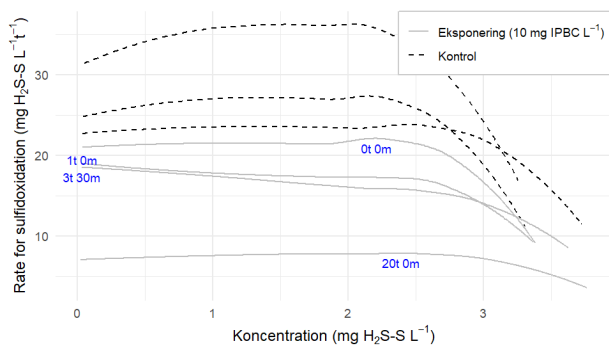
Figur 4.13. Udvikling i rate for svovlbrinteoxidation efter tilsætning af 50 mg benzoesyre L⁻¹. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra tilsætning af benzoesyre. De stiplede sorte linjer er raten for referencecyklusserne (inden tilsætning af benzoesyre) og de fulde grå linjer er raten for cyklusser efter tilsætning af benzoesyre.

Effekten af PCMC på sulfidoxidationen er vist på figur 4.14. På figuren ses det, at sulfidoxideringsraten aftager kontinuerligt med nogenlunde samme interval frem til 4 timers eksponering, hvorefter raterne stabiliserer sig på et lavt niveau. Dette forløb ligner den tendens, der ses på figur 4.2 i sektion 4.1, hvor faldet i rate over tid tilskrives akklimatisering som følge af ændringer i pH. Derfor kan det ikke entydigt konkluderes, at eksponering for 10 mg PCMC L⁻¹ er ansvarlig for det observerede fald i raten for sulfidoxidation.

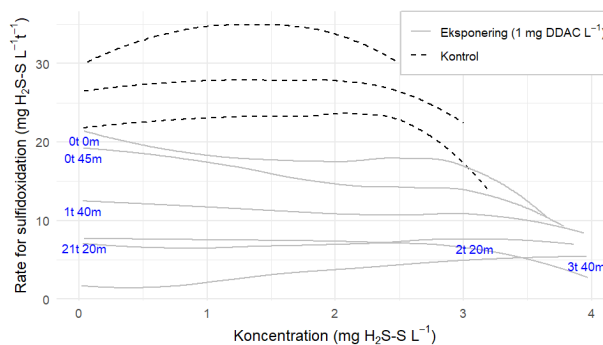


Figur 4.14. Udvikling i rate for svovlbrinteoxidation efter tilsætning af 10 mg PCMC L⁻¹. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra tilsætning af PCMC. De stiplede sorte linjer er raten for referencecyklusserne (inden tilsætning af PCMC) og de fulde grå er raten for cyklusser efter tilsætning af PCMC.

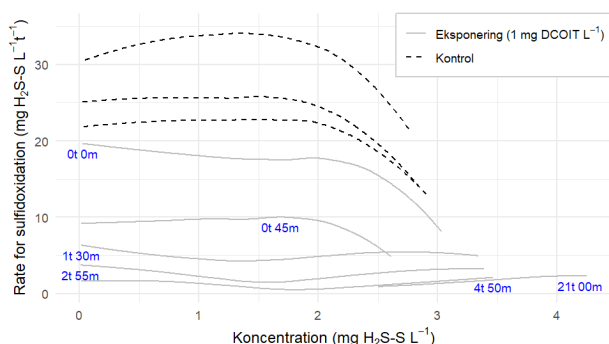
På figurerne 4.15 til 4.18 ses effekten af hhv. 10 mg IPBC L^{-1} , 1 mg DDAC L^{-1} , 1 mg DCOIT L^{-1} og 5 mg propiconazol L^{-1} på sulfidoxidationen. De følger alle samme tendens som for ovenstående figur (figur 4.14), og derfor kan det observerede fald i raterne ikke nødvendigvis tilskrives en hæmmende effekt fra biociderne på sulfidoxideringsraten.



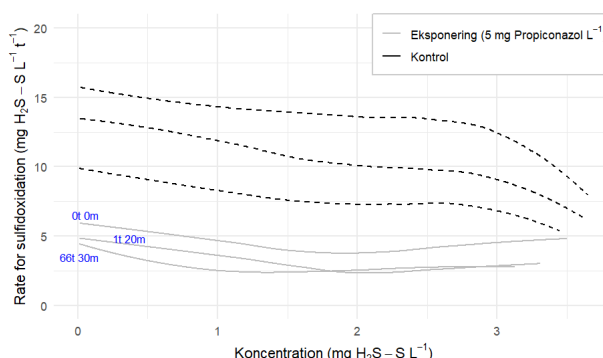
Figur 4.15. 10 mg IPBC L^{-1} .



Figur 4.16. 1 mg DDAC L^{-1} .



Figur 4.17. 1 mg DCOIT L^{-1} .



Figur 4.18. 5 mg propiconazol L^{-1} .

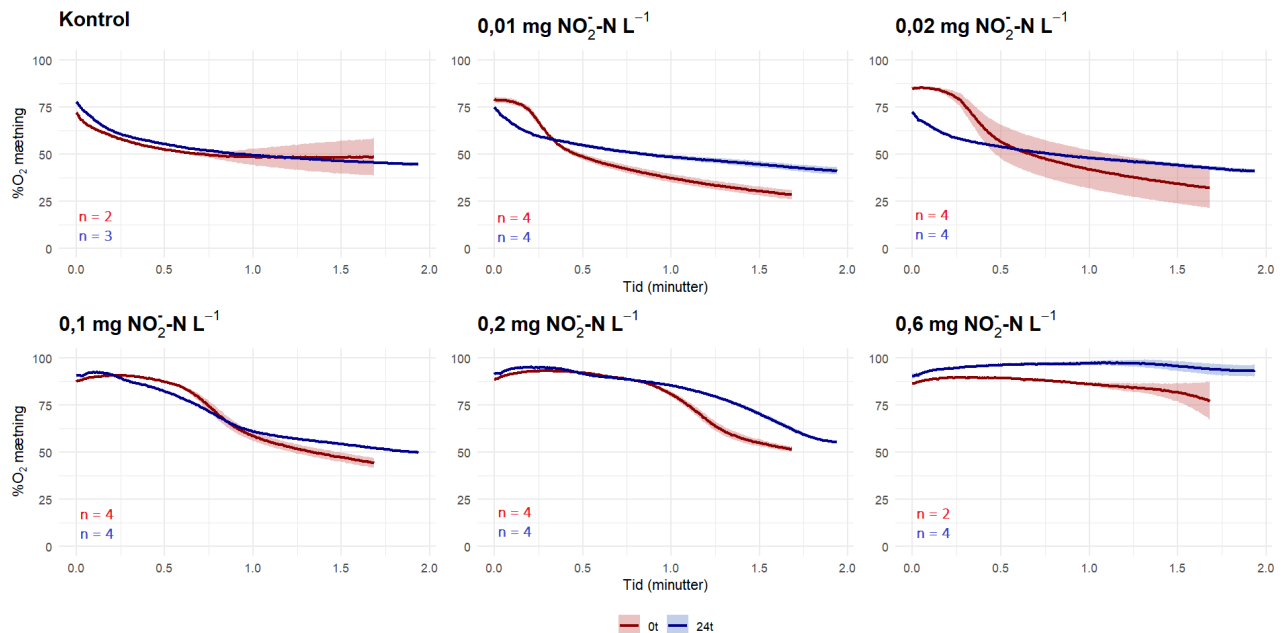
Udvikling i rate for svovlbrinteoxidation efter tilsætning af biocid. Den blå tekst indikerer tiden (timer, minutter) ved hver cyklusstart målt fra tilsætning af biocid. De stiplede sorte linjer er raten for referencecyklusserne (inden tilsætning af biocid) og de fulde grå er raten for cyklusser efter tilsætning af biocid.

4.5 Eksponeringsanalyse af nitrit

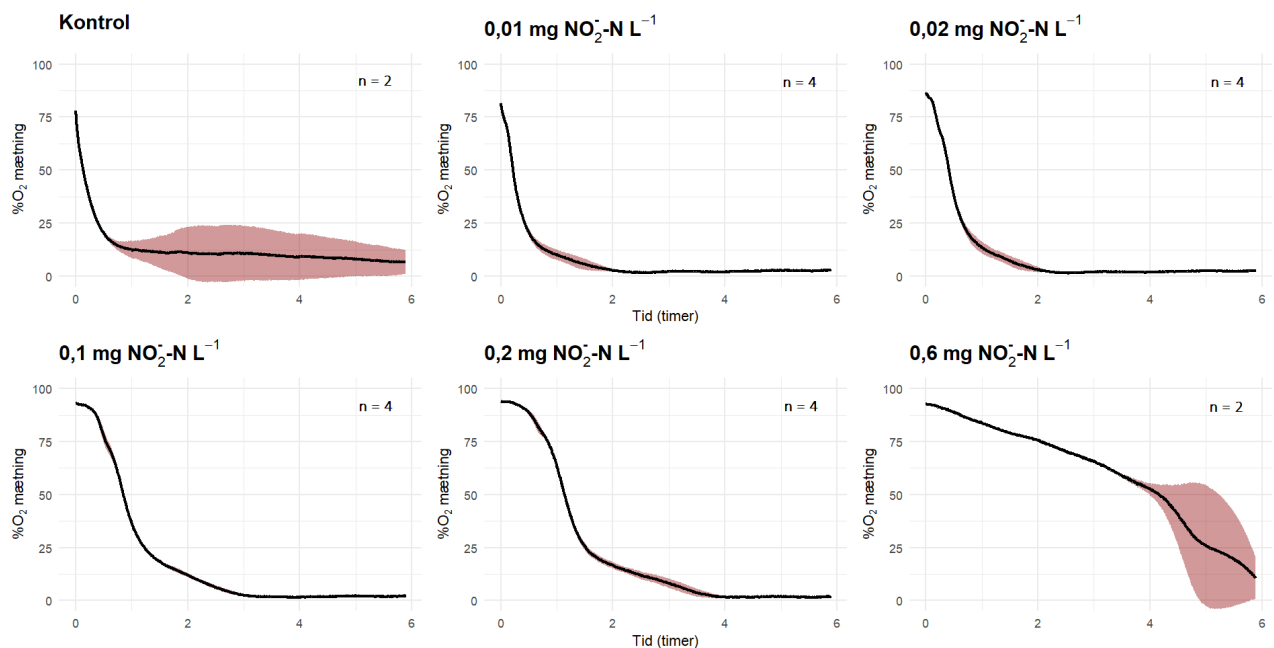
Ud fra de ovenstående forsøg med forskellige teststoffer viste nitrit sig at have en interessant effekt på raten for sulfidoxidationen. På baggrund af dette blev der udført nogle yderligere forsøg, hvor koncentrationseffekten af nitrit på iltforbruget under biotisk sulfidoxidation blev undersøgt.

Figur 4.19 viser iltforbruget fra *A. thiooxidans* ved sulfidoxidation, ved eksponering for forskellige nitritkoncentrationer i henholdsvis 0 og 24 timer. Generelt ses der en lagfase for iltforbruget, den initiale periode af bakteriernes væksthase, der forlænges som resultat af stigende nitritkoncentration,

specielt for forsøget med direkte eksponering (0 timer). Eksponering i 24 timer medfører generelt et lidt lavere iltforbrug sammenlignet med 0 timers eksponering, hvilket kan indikere, at eksponeringstiden har en mindre effekt.



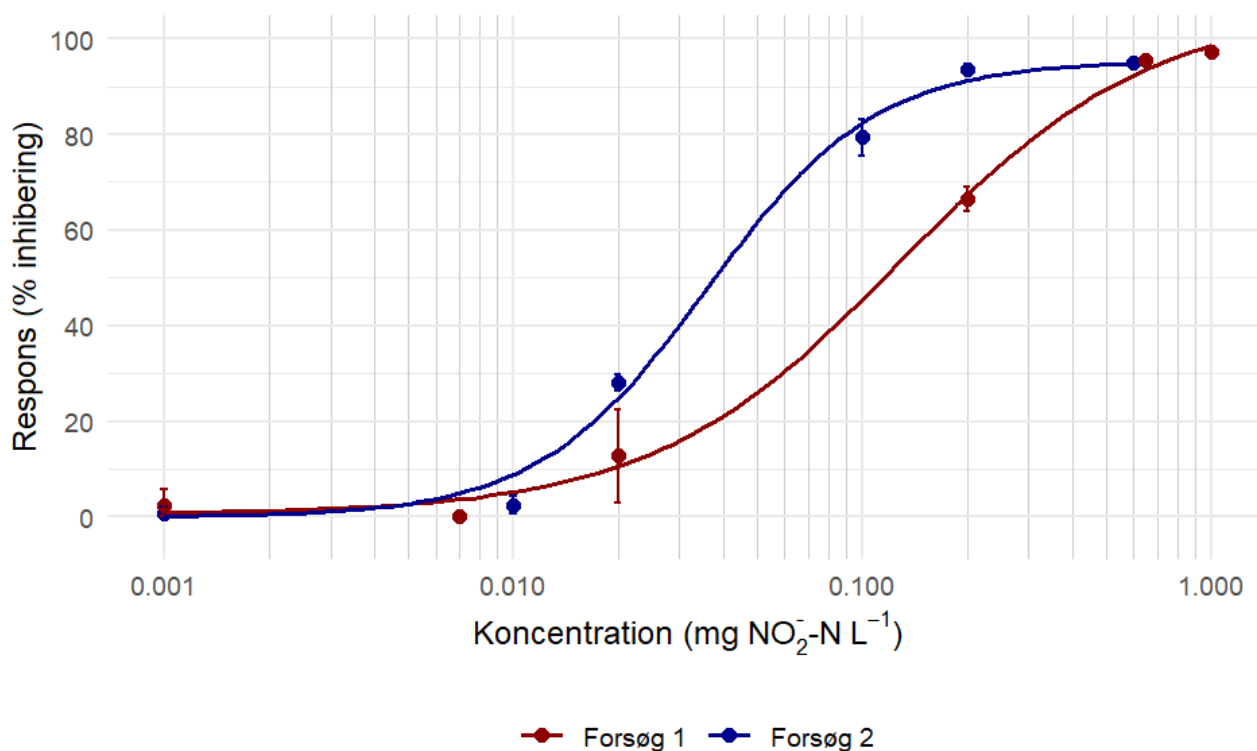
Figur 4.19. Iltforbrug fra *A. thiooxidans* ved sulfidoxidation efter eksponering i 0 og 24 timer med henholdsvis 0, 0,01, 0,02, 0,1, 0,2 og 0,6 mg NO₂⁻-N L⁻¹. Linjerne angiver det gennemsnitlige iltforbrug (%-iltmætning, ±SD-bånd), og n angiver antallet af gentagelser medtaget.



Figur 4.20. Iltforbrug fra *A. thiooxidans* ved sulfidoxidation med henholdsvis 0, 0,01, 0,02, 0,1, 0,2 og 0,6 mg NO₂⁻-N L⁻¹. Linjerne angiver det gennemsnitlige iltforbrug (%-iltmætning, ±SD-bånd), og n angiver antallet af gentagelser medtaget.

Figur 4.20 illustrerer iltforbruget fra *A. thiooxidans* ved sulfidoxidation, ved eksponering for forskellige nitritkoncentrationer over 6 timer. Ved koncentrationer mellem 0,01 og 0,2 mg NO_2^- -N L^{-1} bliver alt tilgængelig ilt forbrugt indenfor 4 timer. Ved en koncentration på 0,6 mg NO_2^- -N L^{-1} går iltforbruget langsommere, men ender på en iltmætning under 10%. Der ses en stigende lagfase og en efterfølgende lavere forbrugsrate med stigende nitritkoncentration.

På baggrund af ovenstående resultater, samt et lignende forsøg (se bilag A), blev der udarbejdet en dosis-responskurve, som kan ses på figur 4.21. Kurven viser inhibering af det bakterielle iltforbrug efter 30 minutters eksponering for de enkelte nitritkoncentrationer relativt til kontrolforbruget efter 30 minutter. Resultaterne viser en begyndende inhibering af iltoptaget ved en nitritkoncentration på omkring 0,01 mg NO_2^- -N L^{-1} , og ved en koncentration på $>0,6$ mg NO_2^- -N L^{-1} blev der observeret en inhibering på $>90\%$. Dette indikerer en dosisafhængig hæmning af iltforbruget og dermed aktiviteten af *A. thiooxidans* ved en eksponering på 30 minutter.



Figur 4.21. Dosis-respons-kurve for *A. thiooxidans* ved eksponering af forskellige nitritkoncentrationer (mg NO_2^- -N L^{-1}) under to separate forsøg. Responsen er angivet som inhibering (%) af det bakterielle iltforbrug efter 30 minutters eksponering for de enkelte nitritkoncentrationer relativt til kontrolforbruget efter 30 minutter. For forsøgenes datapunkter ($\pm$ SD) er der foretaget logistisk regression som er visualiseret med en logaritmisk x-akse.

5. Diskussion

5.1 Effekt af nitrit på sulfidoxidation

På baggrund af ovenstående resultater viste en tilsætning af nitrit at kunne påvirke raten for sulfidoxidation og dermed inhibere *A. thiooxidans* på 3-4 timer (Figur 4.11). Dette stemmer godt overens med litteraturen, hvor studier har vist, at nitrit hæmmer metabolismen for både SRB og SOB i spildevandssystemer [Gao et al., 2016; Sun et al., 2015]. Li et al. [2020a] demonstrerede en 30% lavere sulfidoxidation for beton iblandet calciumnitrit sammenlignet med kontrollen over en forsøgsperiode på 18 måneder under virkelige kloakforhold. Dette tyder på, at nitrit kan fungere som inhibitor under flere forskellige forhold. Når nitrit udsættes for sure forhold, omdannes det til FNA [Li & Jiang, 2022]. Koncentrationen af FNA er afhængig af koncentrationen af nitrit, temperatur og pH og følger følgende sammenhæng: $FNA \text{ som } HNO_2 - N = NO_2^- - N / ((e^{-\frac{2300}{270+T(^{\circ}C)}}) \cdot 10^{pH})$ [Anthonisen et al., 1976; Li & Jiang, 2022]. Koncentrationen af FNA har en stærk korrelation til den bakteriostatiske effekt, og er meget mere effektiv end nitrit [Jiang et al., 2011; Sun et al., 2015]. Li et al. [2020a] påpeger, at FNA kan have en specifik skadelig virkning på *A. thiooxidans* respiratoriske veje, hvilket bekræftes af resultaterne opnået i denne rapport.

Resultaterne opnået i denne rapport viste ydermere, at nitrit og svovlbrinte reagerer kemisk med et støkiometrisk forhold på 1,73 (mol H_2S -S/mol NO_2^- -N) i en 2,2-ordens reaktion og viste tilmed, at reaktionen er stærkt afhængig af svovlbrintekoncentrationen (Ligning 4.1). Det er en kompleks reaktion, hvor svovlbrinte og nitrit i form af FNA reagerer og danner produkter såsom elementært svovl, kvælstofmonoxid, lattergas, og ammoniak [Bagster, 1928]. Sammenlignes de biotiske rater for sulfidoxidation under tilstedeværelse af nitrit med raten for den kemiske reaktion mellem svovlbrinte og nitrit (Figur 4.11 og 4.9), fremgår det, at den kemiske reaktion har en væsentlig indflydelse på raterne for den biotiske sulfidoxidation. Dog kan alt svovlbrinteforbruget ikke tilskrives den kemiske reaktion. Det tyder på, at der fortsat er mikrobiel aktivitet i de første timer efter eksponering for nitrit, dog betydeligt hæmmet. Dette ses, da raten for den kemiske reaktion i cyklus 2 og 3 (Figur 4.9) nærmer sig nul, mens den biotiske rate forbliver højere i samme periode (Figur 4.11). Dette tyder på, at bakterierne stadig er aktive. Efter 20,5 time ses et minimalt forbrug af svovlbrinte (Figur 4.11), hvilket kan indikere, at nitritten er opbrugt, og bekræfter samtidig, at 5 mg NO_2^- -N L^{-1} har inhiberet *A. thiooxidans* svovlbrinteforbrug.

I undersøgelsen af bakteriernes respons på forskellige doser af nitrit målt i iltforbrug, blev der ved en koncentration på $>0,6 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ observeret en inhibering på $>90\%$ ved en 30 minutters eksponering (Figur 4.21). Dette er en lavere nitritkoncentration end den anvendte i forsøgsreaktoren på $5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$. Der blev umiddelbart set en højere inhibering på iltforbruget end raten for sulfidoxidation (Figur 4.11) på trods af en lavere koncentration af nitrit. Det skal dog bemærkes, at der er anvendt forskellige indikatorer for mikrobiel aktivitet i de to forsøg. Yderligere blev der observeret en forlænget lagfase uden iltforbrug, som korrelerede med stigende nitritkoncentration (Figur 4.20). Dette havde en betydning på raten for iltforbruget. Ved 5 ud af 6 nitritkoncentrationer blev alt ilt dog forbrugt i løbet af 6 timer, og for den sidste nitritkoncentration er det sandsynligt, at ilten også var blevet opbrugt, hvis forsøget havde varet længere. Dette indikerer, at bakterierne ved de anvendte koncentrationer ikke inaktiveres fuldstændig af nitrit, men blot hæmmes. Det kan bl.a. skyldes, at nitrit og svovlbrinte reagerer kemisk indtil nitrit er opbrugt, og dermed udsætter det mikrobielle iltforbrug. Den observerede forsinkelse vanskeliggjorde desuden opstillingen af dosis-responskurven, da responsen både afhænger af koncentration og eksponeringstid. Kurven (Figur 4.21) er baseret på en eksponeringstid på 30 minutter. Ved en længere eksponeringstid, fx 3 timer, ville kurven se anderledes ud, hvilket understøtter antagelsen om øget inhibering ved stigende eksponeringstid, som også fremhæves af Sun et al. [2015]. Resultaterne fra forsøget med 24 timers nitriteksponering (Figur 4.19) tyder det dog ikke på, at eksponeringstiden har nogen betydelig effekt. Det skal dog bemærkes, at bakterierne i dette forsøg samtidig var blevet sultet i et døgn, og at svovlbrintekoncentrationen var lavere. Disse faktorer kan have bidraget til den lille forskel mellem eksponeringstiderne og kan muligvis have overskygget effekten af nitrit.

5.2 Effekt af aluminium på sulfidoxidation

Aluminium viste umiddelbart ikke at kunne inhibere *A. thiooxidans* (Figur 4.12) ved en koncentration på 3 g Al L^{-1} . Dette bekræfter den begrænsede bakteriostatisk effekt af Al^+ over længere tid som Buvignier et al. [2019b] og Buvignier et al. [2019a] også påviser. Dog formåede Buvignier et al. [2019b] at dokumentere en kortvarig inhibering af vækstraten ved en pH på hhv. 2 og 4, hvor den største hæmning blev set ved pH 4. Dette projekt benytter en lavere pH ($\sim 1,8$) hvilket muligvis kan forklare den manglende inhibering. Resultaterne indikerer yderligere, at syrebeskyttelsen i CAC-beton primært ligger i den fysiske barriere, der dannes via en aluminiumsgel på overfladen af betonen, fremfor i en direkte bakteriostatisk effekt af aluminium [Buvignier et al., 2019b].

5.3 Effekt af udvalgte biocider på sulfidoxidation

Forsøgene med biociders inhiberingseffekt på *A. thiooxidans*, viste alle en nedgang i raten for sulfidoxidation som følge af gentagende cyklusser (Figur 4.13 til 4.18). Ingen af biociderne medførte en fuldstændig inhibering umiddelbart efter tilsætning. Denne observation kan skyldes, at biociders hæmmende effekt ofte kræver en eksponeringstid på flere timer [Moradi et al., 2013]. Det var yderligere ikke muligt at kortlægge de anvendte biociders syrestabilitet præcist. Det er derfor muligt, at de sure forhold i reaktoren har påvirket stabiliteten og/eller effektiviteten af de anvendte biocider. Rateudviklingen for biociderne fulgte en generel tendens, hvor raterne gradvist aftog over tid gennem forsøgenes cyklusser. En tilsvarende tendens blev observeret i kontrolforsøgene uden tilsat biocid (Figur 4.2), og derfor blev mulige grunde til dette undersøgt. Det viste sig, at bakteriekulturen havde en pH på omkring 2,1, mens forsøgskolben havde en på 1,8. *A. thiooxidans* viste sig at have tilpasset sig pH'en i bakteriekulturen, hvorefter aktiviteten faldt ved et skift til pH 1,8 i forsøgskolben (Figur 4.3) grundet akklimatisering. Denne akklimatisering kan have forstyrret sulfidoxiderationsraterne, og dermed fået biociderne til at syne mere inhiberende, end de reelt var. Det indikerer ydermere, at *A. thiooxidans* aktivitet er relativt sensitiv for pH-udsving. Det er desuden vigtigt at påpege, at forsøgskolben havde en pH tættere på 2,1 under forsøgene med nitrit og aluminium, hvorfor samme inhibering ikke sås ved disse teststoffer.

Benzoesyre viste sig at være mere effektiv end de øvrige biocider til at reducere sulfidoxiderationsraten, idet der allerede i de to første cyklusser blev observeret et betydeligt fald i rate (Figur 4.13). Det vurderes derfor, at benzoesyre ved en koncentration på 50 mg L^{-1} kan inhibere *A. thiooxidans*. Kang and Ye [2022] demonstrerede, at benzoat (salt af benzoesyre) tilsat til alkali-aktiveret slagge cement (AAS cement) havde en antimikrobiel effekt. Ved en tilsætning på 3% benzoate (af den samlede cementvægt) blev væksten af *A. thiooxidans* hæmmet med 95% over 28 dage. Benzoesyre anvendes almindeligt som konserveringsmiddel i fødevarer med lav pH, herunder kulsyreholdige drikke [Jorge, 2003]. At stoffet også viser sig effektiv over for *A. thiooxidans*, er derfor forventeligt, da det benyttes til at bekæmpe mikroorganismer, der trives ved lav pH.

5.4 Støkiometri, variation i rate og indikator for aktivitet

Overordnet set, er der visse usikkerheder forbundet med de opnåede resultater. Eksempelvis blev det støkiometriske forhold mellem ilt og svovlbrinte beregnet til at være $0,344 \text{ mol O}_2/\text{mol H}_2\text{S}$ (Figur 4.6). Dette er lavere end den teoretiske værdi på $0,5 \text{ mol O}_2/\text{mol H}_2\text{S}$, som gælder under antagelse

af, at svovlbrinte oxideres til elementært svovl [Jensen, 2009]. Hvis svovlbrinte i stedet oxideres til thiosulfat, vil det teoretiske iltforbrug være endnu højere (Figur 2.3). Elementært svovl er den næstmest reducerede svovlforbindelse, efter svovlbrinte, og kræver derfor relativt lidt ilt ved oxidation. Det observerede lave støkiometriske forhold kan indikere usikkerhed i sensormålingerne. En mulig forklaring kan være unøjagtigheder i konverteringen fra det elektriske signal fra svovlbrintesensoren til koncentration (som beskrevet i afsnit 3.2). Måleusikkerhederne formodes at være systematiske og ensartet på tværs af forsøgene, og derfor bør det stadig være validt at sammenligne resultaterne mellem forsøgene.

Generelt var der en betydelig variation i de målte referencerater for den mikrobielle sulfidoxidation (Figur 4.5). Dette kan tilskrives en variation i koncentrationen af bakterier i bakteriekulturen ved udtagningstidspunktet. Bakteriekulturen blev løbende fortyndet, og dermed har koncentrationen af biomasse varieret over tid. Dette blev der imidlertid ikke korrigeret for i beregningerne af sulfidoxideringsraterne, hvilket kunne have påvirket sammenligneligheden imellem de enkelte forsøg. Derfor blev der udelukkende taget udgangspunkt i raten for referencecyklusserne ved vurdering af inhiberingseffekt for de enkelte forsøg. I dette studie blev ændringen i svovlbrintekonzentration anvendt som indikator for mikrobiel aktivitet. Svovlbrinte er et flygtigt og reaktivt stof, som kan interagere med andre forbindelser, herunder ilt og nitrit, hvilket kan medføre usikkerheder i datagrundlaget. En måde at minimere denne usikkerhed kunne være ved at benytte mere stabile substrater, såsom elementært svovl. Dette ville dog give andre udfordringer, f.eks. uopløseligheden i vand, ændrede metaboliske veje, støkiometri og koncentrationsbestemmelse, som potentielt kunne komplicere tolkningen af resultaterne yderligere.

En mere præcis tilgang, i vurderingen af teststoffers inhiberingseffekt på bakterieaktiviteten, ville have været at kvantificere biomassen eller dens aktivitet direkte. Eksempelvis har Sun et al. [2015] lavet måling af ATP, og Negishi et al. [2005] har lavet en optælling af celler. Det er dog almen praksis at anvende indikatorer for aktivitet, såsom sulfat- eller svovlbrintekonzentrationer, hvilket bl.a. er benyttet af Li et al. [2020a], Nogami et al. [1997] og Xue and Voordouw [2015]. Derudover benytter Suzuki et al. [1999] og Negishi et al. [2005] sig af iltforbrug som indikator for aktiviteten af *A. thiooxidans*.

5.5 Praktisk implementering af teststoffer i spildevandsledninger

Resultaterne fra denne rapport er udelukkende opnået under kontrollerede laboratorieforhold, og der må derfor kunne forventes afvigelser ved overførsel til virkelige kloakforhold. En væsentlig

forskel er, at teststofferne er frit tilgængelige i forsøgskolben, mens det som en del af betonmatricen i spildevandsledninger må frigives for at sikre eksponering. Eksempelvis er nitrit stærkt vandopløseligt, hvilket betyder, at det i praksis hurtigt vil blive udvasket. For at opnå en tilsvarende inhibitorisk effekt som observeret i laboratoriet, vil det sandsynligvis være nødvendigt med høje koncentrationer af nitrit i betonen. Li et al. [2020a] benyttede en koncentration på $16,8 \text{ kg Ca(NO}_2)_2 \text{ m}^{-3}$ beton (4% af den totale cementvægt) i deres undersøgelse af nitrits indvirkning på sulfidoxidation. Kang and Ye [2022] anvendte en koncentration på 3% benzoat (af den totale cementvægt) i deres undersøgelse af benzoats indvirkning på *A. thiooxidans*. Vigtigst er det at sikre konstant og længerevarende inhibering på betonoverfladen, ved at opretholde en tilstrækkelig koncentration af nitrit og benzoesyre, som opnås ved en løbende nedbrydning af betonen. Derudover må det overvejes, at andre forbindelser i spildevandet eller i selve betonmatricen potentielt kan reagere med nitrit og benzoesyre og reducere deres tilgængelighed som inhibitor. Eksempler herpå kunne være reducerede svovlforbindelser eller ammonium [Zuo et al., 2022].

Litteraturen for brugen af biocider til inhibering af SOB i betonledninger er begrænset. Flere rapporter har dog undersøgt inhibering af SRB med målet om at minimere svovlbrinteproduktion i oliereservoirer og -ledninger [Cheung et al., 1994; Negm et al., 2022; Xue & Voordouw, 2015]. Greene et al. [2006] påviste tilmed, at biocider i kombination med nitrit kan have en synergistisk effekt på inhibering af SRB.

Undersøgelser har vist en markant udvaskning af biocider fra biocidindeholdende bygningsmaterialer [Kohzadi et al., 2024; Reiß et al., 2021]. Hvis biocider anvendes i betonledninger, vil det, trods en fortynding i spildevandet, potentielt kunne påvirke de biologiske processer i det modtagende renseanlæg. Dette er specielt gældende ved de høje koncentrationer, det viser sig at kræve for inhibering af *A. thiooxidans*. Før et biocid anvendes i spildevandsledninger, kræves der derfor en grundig undersøgelse af udvasknings- og transportmekanismerne for det anvendte biocid. Modsat indgår nitrit som en vigtig del af den biologiske spildevandsrensning på et renseanlæg - i form af substrat til denitrificerende bakterier. Dette begrænser de negative effekter, hvorfor tilsætning af nitrit til betonledninger umiddelbart kan anses som et miljøvenligt tiltag, med en samtidig lovende effekt overfor mikrobiel induceret korrosion [Li and Jiang, 2022]. Da nitrit vil forekomme i form af FNA ved udskillelse fra betonoverfladen, grundet den lave pH, kan dette dog potentielt have en betydning for det modtagende renseanlæg. FNA har vist sig at have store konsekvenser for de biologiske processer i et renseanlæg, herunder specielt nitrifikationsprocessen [Zhou et al., 2011]. Som følge af den neutrale pH i spildevandet og FNA's ustabilitet, vurderes det dog, at FNA ikke vil have en negativ påvirkning på det modtagende renseanlæg.

Ud over de kemiske og biologiske forhold er der også en række tekniske udfordringer for praktisk implementering af inhibitorer i beton. Materialets styrke og holdbarhed skal sikres, samtidig med at eventuelle tilsatte stoffer skal kunne håndteres i det modtagende renseanlæg uden at påvirke de biologiske processer negativt. Kang and Ye [2022] demonstrerede, at ved tilsætning af 3% benzoate til AAS cement ville cementstyrken reduceres med 10% sammenlignet med bindingsmidlet uden tilsat benzoate. Raman and Siew [2010] viste, at ved tilsætning af forskellige nitritsalte vil hærdningstiden af cementen øges. Derudover har Li et al. [2020b] påvist, at ved tilsætning af calciumnitrit ($\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$) til sulfatresistent cement, vil luftindholdet og den kumulative porevolumen øges, samt cementstyrken mindskes. Disse ændringer er korrelerende med koncentrationen af calciumnitrit. Dog møder beton iblandet op til 4% calciumnitrit (af den totale cementvægt) fortsat de strukturelle krav.

Det er vigtigt at opretholde en høj betonstyrke og et lavt porevolumen, da disse faktorer kan medvirke til en acceleration af korrosionen. For at kunne bestemme den mest optimale nitrit- og benzoesyre-dosering til beton for langvarig inhibering med en samtidig opretholdelse af de mekaniske egenskaber, kræves der yderligere analyse.

6. Konklusion

Undersøgelsen af den biotiske sulfidoxidation ved eksponering med forskellige teststoffer viste, at 5 mg NO_2^- -N L^{-1} og 50 mg benzoesyre L^{-1} havde en inhiberende effekt på *A. thiooxidans*, da raten for svovlbrinteforbruget var synligt lavere end referenceraterne. Reaktionen ved eksponering for nitrit viste en koncentrationsafhængig sulfidoxideringsrate, der lignede raten for den kemiske reaktion mellem svovlbrinte og nitrit. En koncentration på 0,6 mg NO_2^- -N L^{-1} viste en effekt på *A. thiooxidans* iltforbrug, hvor der efter 30 minutter var et >90% inhiberingsrespons.

Aluminium viste umiddelbart ikke at have nogen effekt ved den udvalgte testkoncentration, da udviklingen i raten for sulfidoxidation ikke var nævneværdigt anderledes end referenceraterne.

En ændring i pH-værdi fra 2,1 til 1,8, viste sig at have en negativ effekt på *A. thiooxidans* sulfidoxidation over tid, som påvirkede synligheden af udvalgte teststoffers inhiberingseffekt. PCMC, IPBC, DDAC, DCOIT og propiconazol viste derfor umiddelbart ikke at have nogen effekt ved de udvalgte testkoncentrationer, da inhiberingstendensen ikke adskilte sig synderligt fra effekten af akklimatiseringen.

Resultaterne opnået ved screening af forskellige teststoffer på laboratorieskala indikerer, at nitrit og benzoesyre har potentiale som tilsætningsstoffer i cement til brug i fremtidige spildevandsledninger for at mindske mikrobiel induceret betonkorrosion. Dette kan konkluderes, da resultaterne viste en kortsigtet inhiberende effekt på *A. thiooxidans* sulfidoxideringsrate. Nitrit er under pilotforsøg allerede succesfuldt implementeret i beton, hvor der skal laves flere indledende undersøgelser med benzoesyre for at sikre de strukturelle krav og en samtidig langsigtet inhiberende effekt på *A. thiooxidans*. Der er hermed et stort potentiale for tilsætning af stoffer med bakteriestatisk effekt til cement for at mindske betonkorrosion. Implementeringen af stofferne i spildevandsledninger kan resultere i en længere levetid, mindske reparationsomkostninger og føre til store besparelser i spildevandssystemer verden over.

Litteraturliste

- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., & Srinath, E. G. (1976). Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid. *Water Pollution Control Federation*, 48(5), 835–852.
- Bagster, L. S. (1928). CCCXLVI.—The reaction between nitrous acid and hydrogen sulphide. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2631–2643.
- Buvignier, A., Peyre-Lavigne, M., Robin, O., Bounouba, M., Patapy, C., Bertron, A., & Paul, E. (2019a). Influence of Dissolved-Aluminum Concentration on Sulfur-Oxidizing Bacterial Activity in the Biodeterioration of Concrete. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(15), e00302–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00302-19>
- Buvignier, A., Patapy, C., Lavigne, M. P., Paul, E., & Bertron, A. (2019b). Resistance to biodeterioration of aluminium-rich binders in sewer network environment: Study of the possible bacteriostatic effect and role of phase reactivity. *Cement and Concrete Research*, 123, 105785. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2019.105785>
- Cheung, C., Beech, I., Campbell, S., Satherley, J., & Schiffrin, D. (1994). The effect of industrial biocides on sulphate-reducing bacteria under high pressure. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 33(4), 299–310. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90008-6)
- Christensen, K. U., Kaasgaard, M., Anderson, J., Pade, C., & Jakobsen, U. H. (2020). *Udvikling af modstandsdygtige betonrør til aggressive miljøer II* [ISBN: 978-87-7038-182-6]. Miljøstyrelsen.
- Cline, J. D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 14(3), 454–458. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454>
- DANVA. (2019). Svovlbrintehåndbogen (version 1.2). <https://www.danva.dk/media/5622/svovlbrinte-haandbogen-version-23-04-2019.pdf>
- ECHA. (2023). *Aluminium sulphate* [Downloadet: 28-04-2025]. <https://echa.europa.eu/da/registration-dossier/-/registered-dossier/7828/5/5/1>.
- Fytianos, G., Banti, D., Dushku, E., Papastergiadis, E., Yiangou, M., & Samaras, P. (2021). Novel Approaches for Biocorrosion Mitigation in Sewer Systems. *Chemistry*, 3(4), 1166–1177. <https://doi.org/10.3390/chemistry3040085>
- Gao, S.-H., Ho, J. Y., Fan, L., Richardson, D. J., Yuan, Z., & Bond, P. L. (2016). Antimicrobial Effects of Free Nitrous Acid on *Desulfovibrio vulgaris*: Implications for Sulfide-Induced Corrosion of Concrete. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5563–5575. <https://doi.org/10.1128/AEM.01655-16>

- Greene, E. A., Brunelle, V., Jenneman, G. E., & Voordouw, G. (2006). Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7897–7901. <https://doi.org/10.1128/AEM.01526-06>
- Herisson, J., Guéguen-Minerbe, M., van Hullebusch, E. D., & Chaussadent, T. (2017). Influence of the binder on the behaviour of mortars exposed to H₂S in sewer networks: a long-term durability study. *Materials and Structures*, 50, 1–18. <https://doi.org/10.1617/s11527-016-0919-0>
- Herisson, J., Guinot, D., & Saucier, F. (2018). Accelerated biodeterioration of various cementitious materials through an accelerated laboratory chamber. *Proceedings of the Final Conference of RILEM 253-MCI Microorganisms-Cementitious Materials Interactions Volume I*, 33–43.
- Herisson, J., van Hullebusch, E. D., Moletta-Denat, M., Taquet, P., & Chaussadent, T. (2013). Toward an accelerated biodeterioration test to understand the behavior of Portland and calcium aluminate cementitious materials in sewer networks. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.007>
- Herisson, J., Guéguen-Minerbe, M., van Hullebusch, E. D., & Chaussadent, T. (2014). Behaviour of different cementitious material formulations in sewer networks. *Water Science and Technology*, 69(7), 1502–1508. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.009>
- Hvitved-Jacobsen, T., Vollertsen, J., & Nielsen, A. H. (2013). *Sewer Processes - Microbial and Chemical Process Engineering of Sewer Networks* (2nd Edition.). Taylor & Francis.
- Hyldig, K. S., With, J., Ringgaard, L. M., Bjørno, K., Pedersen, O. M., Volquartz, M., & Sørensen, T. (2024). Vand i tal 2024. https://www.danva.dk/media/10653/7170083_vand-i-tal-2024-web.pdf
- Islander, R. L., Devinny, J. S., Mansfeld, F., Postyn, A., & Shih, H. (1991). Microbial ecology of crown corrosion in sewers. *Journal of Environmental Engineering*, 117(6), 751–770. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1991\)117:6\(751](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1991)117:6(751)
- Ismail, N., Nonaka, T., Noda, S., & Mori, T. (1993). Effect of carbonation on microbial corrosion of concretes. *Doboku Gakkai Ronbunshu*, 1993(474), 133–138. https://doi.org/10.2208/jscej.1993.474_133
- Jensen, H. S. (2009). *Hydrogen sulfide induced concrete corrosion of sewer networks* (First edition) [ISBN: 978-87-90033-58-3]. Institut for Kemi, Miljø og Bioteknologi, Aalborg Universitet.
- Jiang, G., Gutierrez, O., & Yuan, Z. (2011). The strong biocidal effect of free nitrous acid on anaerobic sewer biofilms. *Water research*, 45(12), 3735–3743. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.026>

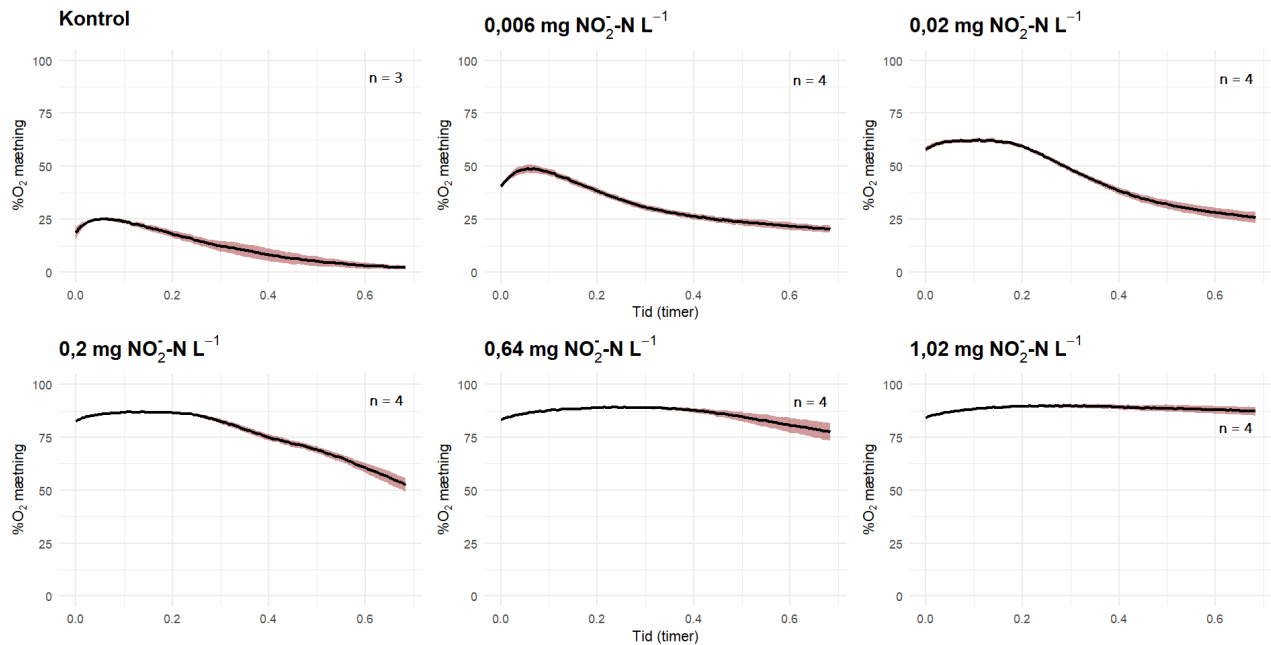
- Jorge, K. (2003). SOFT DRINKS | Chemical Composition. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition, pp. 5346–5352). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01101-9>
- Kang, X., & Ye, H. (2022). Antimicrobial alkali-activated slag through self-intercalation of benzoate in layered double hydroxides. *Cement and Concrete Composites*, 130, 104533. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2022.104533>
- Kempner, E. S. (1966). Acid production by *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 92(6), 1842–1843. <https://doi.org/10.1128/jb.92.6.1842-1843.1966>
- Khan, H. A., Castel, A., Khan, M. S., & Mahmood, A. H. (2019). Durability of calcium aluminate and sulphate resistant Portland cement based mortars in aggressive sewer environment and sulphuric acid. *Cement and Concrete Research*, 124, 105852. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2019.105852>.
- Kiliswa, M. W., Scrivener, K. L., & Alexander, M. G. (2019). The corrosion rate and microstructure of Portland cement and calcium aluminate cement-based concrete mixtures in outfall sewers: A comparative study. Cement and Concrete Research. *Cement and Concrete Research*, 124, 105818. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2019.105818>.
- Kiliswa, M. W., & Alexander, M. G. (2014). Biogenic corrosion of concrete sewer pipes: A review of the performance of cementitious materials. *Proceedings of the XIII Conference Durab Build Mater Components, Sao Paulo, Brazil*, 2–5.
- Kleinjan, W. E., de Keizer, A., & Janssen, A. J. H. (2003). Biologically Produced Sulfur. In R. Steudel (Ed.), *Elemental Sulfur and Sulfur-Rich Compounds I* (pp. 167–188). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b12114>
- Kohzadi, S., Müller, A., Österlund, H., & Viklander, M. (2024). Building surface materials as potential sources of biocides: Insights from laboratory leaching investigations of different material types. *Chemosphere*, 368(14341). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143741>
- Li, X., & Jiang, G. (2022). Mitigation of Microbially Influenced Corrosion of Concrete Sewers Using Nitrite. In S. Arora, A. Kumar, S. Ogita, & Y.-Y. Yau (Eds.), *Biotechnological Innovations for Environmental Bioremediation* (pp. 119–135). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9001-3_5
- Li, X., Bond, P. L., O'Moore, L., Wilkie, S., Hanzic, L., Johnson, I., Mueller, K., Yuan, Z., & Jiang, G. (2020a). Increased Resistance of Nitrite-Admixed Concrete to Microbially Induced Corrosion in Real Sewers. *Environmental Science & Technology*, 54(4), 2323–2333. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06680>

- Li, X., Kappler, U., Jiang, G., & Bond, P. L. (2017). The ecology of acidophilic microorganisms in the corroding concrete sewer environment. *Frontiers in microbiology*, 8, 683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00683>
- Li, X., O'Moore, L., Wilkie, S., Song, Y., Wei, J., Bond, P. L., Yuan, Z., Hanzic, L., & Jiang, G. (2020b). Nitrite admixed concrete for wastewater structures: Mechanical properties, leaching behavior and biofilm development. *Construction and Building Materials*, 233, 117341. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117341>
- Li, Y., He, Y., Guo, H., Hou, J., Suwan Dai, P. Z., Yindong Tong, B.-J. N., Zhu, T., & Liu, Y. (2024). Sulfur-containing substances in sewers: Transformation, transportation, and remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 467, 133618. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133618>
- Liu, Y., Zhou, X., & Shi, H. (2015). Sulfur Cycle by In Situ Analysis in the Sediment Biofilm of a Sewer System. *Journal of Environmental Engineering*, 142(9), C4015011. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000991](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000991)
- Loligo Systems. (2025). *Microplate system (Core)* [Downloadet: 05-05-2025]. <https://loligosystems.com/products/microplate/systems/microplate-system-core-24-channels80ul/>.
- Lors, C., Miokono, E. D. H., & Damidot, D. (2017). Interactions between *Halothiobacillus neapolitanus* and mortars: Comparison of the biodeterioration between Portland cement and calcium aluminate cement. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.010>.
- Moradi, M., Duan, J., & Du, X. (2013). Investigation of the effect of 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one inhibition on the corrosion of carbon steel in *Bacillus* sp. inoculated artificial seawater. *Corrosion Science*, 69, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2012.12.017>
- Mossin, L., & JaKobsen, K. (2006). Sulfatindhold og vandtypebestemmelse. (2). <https://vand-og-jord.dk/wp-content/uploads/2021/04/vj206-sulfatindhold-76.pdf>
- National Center for Biotechnology Information. (2025). *PubChem Compound Summary* [Downloadet: 28-04-2025]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Negishi, A., Muraoka, T., Maeda, T., Takeuchi, F., Kanao, T., Kamimura, K., & Sugio, T. (2005). Growth inhibition by tungsten in the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(11), 2073–2080. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2073>
- Negm, N. A., Altalhi, A. A., Mohamed, N. E. S., Kana, M. T. H. A., & Mohamed, E. A. (2022). Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria during Gas and Oil Production Using Novel Schiff Base Diquaternary Biocides: Synthesis, Antimicrobial, and Toxicological Assessment. *ACS Omega*, 7(44), 40098–40108. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04836>

- Nielsen, A. H., Vollertsen, J., & Hvitved-Jacobsen, T. (2004). Chemical sulfide oxidation of wastewater - effects of pH and temperature. *Water Science and Technology*, 50(4), 185–192. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0258>
- Nielsen, A. H., Vollertsen, J., & Hvitved-Jacobsen, T. (2006). Kinetics and stoichiometry of aerobic sulfide oxidation in wastewater from sewers—Effects of pH and temperature. *Water environment research*, 78(3), 275–283. <https://doi.org/10.2175/106143005x94367>
- Nielsen, A. H., Vollertsen, J., Jensen, H. S., Wium-Andersen, T., & Hvitved-Jacobsen, T. (2008). Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research*, 42(15), 4206–4214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.013>
- Nogami, Y., Maeda, T., Negishi, A., & Sugio, T. (1997). Inhibition of Sulfur Oxidizing Activity by Nickel Ion in *Thiobacillus thiooxidans* NB1-3 Isolated from the Corroded Concrete. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(8), 1373–1375. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1373>
- Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., & Satoh, H. (2007). Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 971–980. <https://doi.org/10.1128/AEM.02054-06>
- Pramanik, S. K., Bhuiyan, M., Robert, D., Roychand, R., Gao, L., Cole, I., & Pramanik, B. K. (2024). Bio-corrosion in concrete sewer systems: Mechanisms and mitigation strategies. *Science of The Total Environment*, 921, 171231. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171231>
- Raman, R. S., & Siew, W. H. (2010). Role of nitrite addition in chloride stress corrosion cracking of a super duplex stainless steel. *Corrosion science*, 52(1), 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2009.08.041>
- Reiß, F., Kiefer, N., Noll, M., & Kalkhof, S. (2021). Application, release, ecotoxicological assessment of biocide in building materials and its soil microbial response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112707. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112707>
- Retsinformation. (2024). *Bekendtgørelse om bekæmpelsesmidler* [Downloadet: 15-05-2025]. <https://www.retsinformation.dk/eli/lta/2024/1503>.
- Roberts, D. J., Nica, D., Zuo, G., & Davis, J. L. (2002). Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49(4), 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00049-5)
- Song, Y., Liu, J., Wang, H., & Shu, H. (2019). Research progress of nitrite corrosion inhibitor in concrete. *International Journal of Corrosion*, 2019(1), 3060869. <https://doi.org/10.1155/2019/3060869>
- Sun, X., Jiang, G., Bond, P. L., Keller, J., & Yuan, Z. (2015). A novel and simple treatment for control of sulfide induced sewer concrete corrosion using free nitrous acid. *Water Research*, 70, 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.020>

- Suzuki, I., Lee, D., Mackay, B., Harahuc, L., & Oh, J. K. (1999). Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 5163–5168. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.5163-5168.1999>
- Ukrainczyk, N., & Grengg, C. (2023). Corrosion Resistance of Calcium Aluminate Cements in Sewer Environments. In G. Jiang (Ed.), *Microbiologically Influenced Corrosion of Concrete Sewers : Mechanisms, Measurements, Modelling and Control Strategies* (pp. 219–231). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-29941-4_10
- Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T., Jensen, N. A., Sørensen, C. S., & Uggerby, M. (2006). Afløbssystemets levetid og renovering: en teknisk, økonomisk og servicerelateret analyse. *Miljøstyrelsen*, (1065).
- Xue, Y., & Voordouw, G. (2015). Control of Microbial Sulfide Production with Biocides and Nitrate in Oil Reservoir Simulating Bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, 6(1387). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01387>
- Yang, L., Zhao, D., Yang, J., Wang, W., Chen, P., Zhang, S., & Yan, L. (2019). *Acidithiobacillus thiooxidans* and its potential application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 7819–7833. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10098-5>
- Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V., & Ng, W. J. (2011). The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water research*, 45(15), 4672–4682. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.025>
- Zuo, Z., Liu, T., Zheng, M., Xing, Y., Ren, D., Li, H., Yang, S., Liu, Y., Yuan, Z., & Huang, X. (2022). Recovery of ammonium nitrate solution from urine wastewater via novel free nitrous acid (FNA)-mediated two-stage processes. *Chemical Engineering Journal*, 440, 135826. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135826>

A. Effekt af nitrit på *A. thiooxidans* iltforbrug



Figur A.1. Iltforbrug af *A. thiooxidans* ved sulfidoxidation med henholdsvis 0, 0,006, 0,02, 0,2, 0,64 og 1,02 mg NO₂⁻-N L⁻¹. Linjerne angiver det gennemsnitlige forbrug ($\pm$ SD-bånd), og n angiver antallet af gentagelser medtaget.