



## **Stimuleret in situ reduktiv deklorering**

### Videnopsamling og screening af lokaliteter

**Jørgensen, T.H.; Scheutz, Charlotte; Durant, N.D.; Cox, E.; Bordum, N:E.; Rasmussen, P.; Bjerg, Poul Løgstrup**

*Publication date:*  
2005

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Jørgensen, T. H., Scheutz, C., Durant, N. D., Cox, E., Bordum, NE., Rasmussen, P., & Bjerg, P. L. (2005). *Stimuleret in situ reduktiv deklorering: Videnopsamling og screening af lokaliteter*. Miljøstyrelsen. Miljøprojekt No. 983

---

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# Stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. Vidensopsamling og screening af lokaliteter.

## Hovedrapport

Torben Højbjerg Jørgensen, COWI A/S  
Charlotte Scheutz, Danmarks Tekniske Universitet  
Neal D. Durant, GeoSyntec Consultants  
Evan Cox, GeoSyntec Consultants  
Niels Erik Bordum, COWI A/S  
Poul Rasmussen, Fyns Amt  
Poul Løgstrup Bjerg, Danmarks Tekniske Universitet

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

# Indhold

<u>FORORD</u>	7
<u>SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER</u>	9
<u>SUMMARY AND CONCLUSIONS</u>	15
<u>1 INDLEDNING</u>	21
<u>1.1 BAGGRUND</u>	21
<u>1.2 FORMÅL</u>	21
<u>1.3 DATAINDSAMLING</u>	21
<u><b>1.3.1 Anvendt litteratur</b></u>	<b>21</b>
<u><b>1.3.2 Skemaer med nøgleinformationer</b></u>	<b>22</b>
<u><b>1.3.3 Anden videnindsamling</b></u>	<b>22</b>
<u>2 NEDBRYDNING AF KLOREREDE ETHENER SAMT 1,1,1-TRIKLORETHAN</u>	23
<u>2.1 NEDBRYDNINGSPROCESSER</u>	24
<u><b>2.1.1 Reduktiv deklorering</b></u>	<b>26</b>
<u><b>2.1.2 Cometabolsk oxidation under aerobe forhold</b></u>	<b>28</b>
<u><b>2.1.3 Direkte oxidation</b></u>	<b>28</b>
<u>2.2 REDOXPROCESSER OG NEDBRYDNING AF KLOREREDE ETHENER</u>	30
<u>2.3 MIKROORGANISMER OG ANAEROB DEKLORERING</u>	32
<u><b>2.4 MIKROBIELLE METODER TIL UNDERSØGELSE AF DEHALOCOCCOIDES</b></u>	35
<u>3 STIMULERET REDUKTIV DEKLORERING: LABORATORIEFORSØG</u>	37
<u>3.1 OVERSIGT OVER LABORATORIEFORSØG</u>	37
<u>3.2 SUBSTRATER - ELEKTRONDONORER</u>	40
<u>3.3 FERMENTERING</u>	41
<u>3.4 MIKROBIEL KONKURRENCE OM HYDROGEN</u>	43
<u>3.5 NEDBRYDNINGSRATER</u>	45
<u>3.6 STYRENDE FAKTORER</u>	49
<u><b>3.6.1 Næringsstoffer</b></u>	<b>49</b>
<u><b>3.6.2 pH</b></u>	<b>50</b>
<u><b>3.6.3 Temperatur</b></u>	<b>50</b>
<u><b>3.6.4 Inhibering på grund af andre forureningskomponenter</b></u>	<b>50</b>
<u><b>3.6.5 Betydning af koncentration og fri fase af opløsningsmidler</b></u>	<b>51</b>
<u>3.7 TREATABILITY-TEST</u>	51
<u><b>3.7.1 Sediment- og grundvandsprøvetagning</b></u>	<b>52</b>
<u><b>3.7.2 Opsætning af flaskeforsøg</b></u>	<b>53</b>
<u><b>3.7.3 Inkubation og udtag til analyser</b></u>	<b>56</b>
<u><b>3.7.4 Databehandling</b></u>	<b>57</b>
<u>4 PILOT- OG FULDSKALA ERFARINGER MED STIMULERET NEDBRYDNING</u>	58
<u>4.1 OVERSIGT OVER FELTERFARINGER</u>	58
<u><b>4.1.1 Lande hvor der er gennemført oprensninger</b></u>	<b>58</b>
<u><b>4.1.2 Hvad kan oprenses?</b></u>	<b>58</b>

4.1.3	<b><i>Principper for oprensning med anaerob deklorering</i></b>	59
4.1.4	<b><i>Aktive og passive in situ systemer</i></b>	60
4.2	<u>LOKALITETSBESTEMTE FORHOLD</u>	63
4.2.1	<b><i>Geologi og hydrogeologi</i></b>	63
4.2.2	<b><i>Grundvandskemi</i></b>	66
4.2.3	<b><i>Fysiske forhold på lokaliteten</i></b>	68
4.3	<u>DIMENSIONERINGSGRUNDLAG</u>	68
4.3.1	<b><i>Lokalitetsbeskrivelse og -feltundersøgelser</i></b>	69
4.3.2	<b><i>Laboratorieforsøg (treatability tests)</i></b>	69
4.3.3	<b><i>Dimensioneringsforsøg i felten</i></b>	69
4.3.4	<b><i>Fuldskala implementering</i></b>	72
4.4	<u>ELEKTRONDONORER</u>	73
4.4.1	<b><i>Valg af elektrondonor</i></b>	73
4.4.2	<b><i>Tilsætning af elektrondonor</i></b>	77
4.4.3	<b><i>Forbrug og levetid af donorer</i></b>	78
4.4.4	<b><i>Tilklogning af borer</i></b>	78
4.5	<u>BIOAUGMENTATION - TILSÆTNING AF BAKTERIEKULTURER</u>	83
4.5.1	<b><i>Bakteriekulturer</i></b>	84
4.5.2	<b><i>Vurdering af behov for bioaugmentation</i></b>	84
4.5.3	<b><i>Volumen af bakteriekoncentration</i></b>	85
4.5.4	<b><i>Levering, håndtering og tilsætning af bakteriekulturer</i></b>	86
4.6	<u>MONITERING AF OPRENSNINGSEFFEKTEN</u>	87
4.6.1	<b><i>Moniteringsboringer</i></b>	88
4.6.2	<b><i>Moniteringsprogram</i></b>	89
4.6.3	<b><i>Moniteringsparametre</i></b>	89
4.7	<u>OBSERVEREDE NEDBRYDNINGSRATER</u>	90
4.8	<u>OPRENSNINGSEFFEKT</u>	91
4.9	<u>TIDSPERSPEKTIV FOR AFSLUTNING AF SAGER OG TILBAGESLAGSMÅLINGER</u>	92
5	<b><u>RISIKOFORHOLD VED STIMULERET ANAEROB NEDBRYDNING</u></b>	95
5.1	<u>FORHOLD I DANMARK</u>	95
5.1.1	<b><i>Lovgivning</i></b>	95
5.1.2	<b><i>Erfaringer i Danmark</i></b>	95
5.2	<u>FORHOLD I EUROPA</u>	97
5.2.1	<b><i>Det Europæiske Miljøagentur</i></b>	97
5.2.2	<b><i>Erfaringer i Holland</i></b>	97
5.3	<u>FORHOLD I NORDAMERIKA</u>	98
5.3.1	<b><i>Tilsætning af elektrondonorer til grundvand</i></b>	98
5.3.2	<b><i>Patogene stoffer og tilsætning af bakteriekulturer</i></b>	98
5.3.3	<b><i>Reinjektion af forurenede grundvand</i></b>	99
6	<b><u>ØKONOMI</u></b>	100
6.1	<u>ERFARINGER FRA DANMARK</u>	100
6.2	<u>ERFARINGER FRA NORDAMERIKA</u>	100
6.2.1	<b><i>Elektrondonorer</i></b>	100
6.2.2	<b><i>Bakteriekulturer</i></b>	101
6.2.3	<b><i>Laboratorietest</i></b>	102
6.2.4	<b><i>Pilotforsøg</i></b>	102
6.2.5	<b><i>Fuldskalaoprensning på en hypotetisk lokalitet</i></b>	102
6.3	<u>ERFARINGER FRA HOLLAND</u>	104
7	<b><u>SAMMENFATNING AF LITTERATURSTUDIE</u></b>	105
7.1	<u>INDLEDNING</u>	105
7.2	<u>REDUKTIV ANAEROB DEKLORERING</u>	105

7.3	<u>ANVENDELSE AF ANAEROB DEKLORERING SOM AFVÆRGE</u>	107
7.4	<u>STIMULERING MED ELEKTRONDONOR OG BAKTERIER</u>	108
7.5	<u>ØKONOMI, MYNDIGHEDSBEHANDLING OG AFSLUTNING AF SAGER</u>	110
7.6	<u>UDVIKLINGSBEHOV</u>	111
<b>8</b>	<b><u>SCREENING AF LOKALITETER</u></b>	<b>114</b>
8.1	<u>FORSLAG TIL SCREENINGSMODEL</u>	114
8.2	<u>KRITERIER FOR SCREENINGSMODELLEN</u>	115
8.2.1	<b><i><u>Forundersøgelser og hydrogeologisk profil</u></i></b>	<b>115</b>
8.2.2	<b><i><u>Forureningsprofil</u></i></b>	<b>117</b>
8.2.3	<b><i><u>Geokemisk profil</u></i></b>	<b>118</b>
8.2.4	<b><i><u>Logistiske faktorer</u></i></b>	<b>118</b>
8.3	<u>VALG AF LOKALITETER</u>	118
8.3.1	<b><i><u>Præsentation af lokaliteter som indgår i screeningen</u></i></b>	<b>118</b>
8.3.2	<b><i><u>Definition af indsatsområde</u></i></b>	<b>120</b>
8.4	<u>RESULTAT AF SCREENINGEN</u>	121
8.4.1	<b><i><u>Forundersøgelser og hydrogeologisk profil</u></i></b>	<b>121</b>
8.4.2	<b><i><u>Forureningsprofil</u></i></b>	<b>123</b>
8.4.3	<b><i><u>Geokemisk profil</u></i></b>	<b>124</b>
8.4.4	<b><i><u>Logistiske forhold</u></i></b>	<b>125</b>
8.4.5	<b><i><u>Samlet score</u></i></b>	<b>127</b>
8.5	<u>UDVÆLGELSE AF LOKALITETER</u>	129
8.6	<u>VURDERING AF SCREENINGSMODEL</u>	132
<b>9</b>	<b><u>REFERENCELISTE</u></b>	<b>135</b>
9.1	<u>REFERENCELISTE</u>	135
9.2	<u>REFERENCER FOR HENVENDELSE TIL MYNDIGHEDER OG RÅDGIVERE</u>	153



# Forord

Stimuleret *in situ* reduktiv deklorering er i Nordamerika en af de mest lovende metoder til oprensning af klorerede opløsningsmidler i grundvandet. Der er her efterhånden stor erfaring med metoden - især inden for de sidste 5 år - hvor der er gennemført en række pilot- og fuldskala oprensninger. I Danmark er der kun et enkelt eksempel på felterfaringer i form af et pilotforsøg.

I forhold til mange andre oprensningsmetoder er stimuleret reduktiv deklorering forholdsvis kompliceret, da den udover de traditionelle arbejdsområder (hydrogeologi, forureningskemi, dimensionering og implementering) omfatter et meget betydende mikrobiel og geokemisk element, især efter at bioaugmentation (tilsætning af bakterier) indgår som en del af teknologien.

Da metoden i Nordamerika regnes som en af de mest lovende afværgemetoder, er der i Danmark stigende interesse fra såvel myndigheder, forskningsinstitutioner og rådgivere i at få afprøvet metoden under danske forhold. For at undgå for mange opstartsvanskeligheder, er der ligeledes en erkendelse af, at det er vigtigt at få overført nogle af de væsentligste erfaringer, som der allerede er høstet i udlandet.

I dette projekt gennemføres der en opsamling af den viden, som nationalt og internationalt er tilgængelig om emnet. Der udvikles ligeledes en screeningsmodel, som kan anvendes til en indledende vurdering af, om oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på en given lokalitet, er en mulighed.

Projektet er gennemført som et samarbejde mellem Miljø & Ressourcer DTU, GeoSyntec Consultants og COWI A/S. Projektet er udført for Fyns Amt og er et led i Miljøstyrelsens Teknologiprogram for jord- og grundvandsforurening. GeoSyntec Consultants, som medvirker i projektet er et canadisk firma, og er et af de firmaer i Nordamerika, som har størst erfaring med metoden, både med hensyn til laboratorieforsøg og praktiske erfaringer i felten.

Miljøstyrelsen har nedsat en styregruppe til at følge arbejdet. Styregruppen har bestået af:

- Poul Rasmussen (formand) og Jacob Weber, Fyns Amt
- Ulla Højsholt og Inger Asp Fuglsang, Miljøstyrelsen
- Peder Johansen, Københavns Amt
- Mogens R. Flindt, Syddansk Universitet

Rapporten er opdelt i en hovedrapport og en særskilt appendiksrapport.





# Sammenfatning og konklusioner

Denne rapport belyser muligheden for at anvende stimuleret *in situ* reduktiv deklorering som afværgeteknologi i forhold til danske lokaliteter, der er forurenede med klorerede opløsningsmidler. Projektet er udført under Miljøstyrelsens Teknologiprogram for jord- og grundvandsforurening i samarbejde med Fyns Amt.

Projektet er gennemført som et samarbejde mellem Danmarks Tekniske Universitet - Miljø & Ressourcer DTU, GeoSyntec Consultants og COWI A/S.

I rapporten er der gennemført en opsamling af den viden, som nationalt og internationalt er tilgængelig om emnet. Der udvikles ligeledes en screeningsmodel til en indledende vurdering af oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på en given lokalitet. Modellen bliver i første omgang anvendt til at screene 13 lokaliteter på Fyn, som alle er forurenede med klorerede opløsningsmidler.

Projektet er afgrænset til at omfatte nedbrydning af klorerede ethener samt 1,1,1-TCA.

Vidensopsamling

## Reduktiv anaerob deklorering

Stimuleret *in situ* reduktiv deklorering er en afværgeteknologi, der kan anvendes ved oprensning af grunde forurenede med klorerede ethener, hvorved de naturlige nedbrydningsprocesser i grundvandssystemet stimuleres ved tilsætning af elektrondonor og/eller bakterier. Ved anaerob deklorering sker en trinvis fjernelse (substitution med hydrogen) af kloratomerne, så der fra PCE dannes TCE, *cis*-DCE, VC og til sidst ethen. Anaerob deklorering er en redoxproces, hvor visse bakterier benytter de klorerede ethener som elektronacceptor til generering af energi i en respirationsproces ofte kaldet halorespiration. De fleste halorespirerende bakterier anvender hydrogen som den primære elektrondonor i nedbrydningen af klorerede ethener. Processen kan forløbe naturligt i forurenede grundvandssystemer under stærkt reducerende redoxforhold, men vil ofte være begrænset af mangel på elektrondonor.

Flere halorespirerende bakterier kan deklorere PCE eller TCE til *cis*-DCE, men der er i dag kun kendskab til én renkultur *Dehalococcoides ethenogens* 195, der reduktivt kan deklorere PCE eller TCE fuldstændigt til ethen. Det sidste trin i dekloreringsfølgen fra vinylklorid til ethen foregår formentlig ved cometabolsk transformation og er ikke kædet sammen med halorespiration. *Dehalococcoides ethenogens* 195 tilhører bakteriestammen *Dehalococcoides*, som har den egenskab, at den kan foretage reduktiv deklorering fra *cis*-DCE til VC. I praksis er dette overordentlig vigtigt, da det betyder, at den anaerobe deklorering fra PCE til *cis*-DCE kun kan ses som første del af processen. Forekomsten af *cis*-DCE beviser derfor ikke i sig selv, at der kan ske fuldstændig nedbrydning til vinylklorid og ethen på en lokalitet. Manglende tilstedeværelse af *Dehalococcoides* er sandsynligvis ensbetydende med, at anaerob deklorering fra *cis*-DCE til VC ikke finder sted.

Anvendelse af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering som afværgeteknologi  
Ved anvendelse af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering som afværgeteknologi tilsættes der elektrondonorer ofte i form af organisk stof samt næringsstoffer til den mættede zone. Ved fermentering af elektrondonoren dannes der hydrogen, som anvendes i den reduktive deklorering. Tilsætning af elektrondonorer alene (uden bakterietilsætning) benævnes "biostimulering". Tilsættes der samtidig bakteriekultur benævnes det "bioaugmentation".

Hovedparten af erfaringer med metoden i pilot- og fuldskala er opnået i Nordamerika. Der er også en del aktiviteter i Holland, men der er kun få publikationer herfra i den internationale litteratur. I Danmark er der kun et enkelt eksempel på felterfaringer i form af et pilotforsøg.

Metoden kan anvendes på både klørerede ethener og 1,1,1-TCA. Fjernelse af den frie fase anbefales altid forud for en oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. Potentialet for at stimulere nedbrydning af frie faser af opløsningsmidler eller på grænsefladen mellem frie faser og forureningsfanen er ud fra laboratorieforsøg tilsyneladende til stede. Dette forhold er et væsentligt forskningsområde og undersøges i øjeblikket i felten i Nordamerika i pilotforsøg.

Da stimuleret *in situ* reduktiv deklorering består af tilsætning af elektrondonorer og næringsstoffer til grundvand, er teknologien indtil videre kun brugbar til behandling i den mættede zone.

#### Principper for oprensning

Ved feltoprensninger opereres der med henholdsvis aktive og passive systemer.

Aktive systemer benytter konstant eller pulserende tilsætning af elektrondonorer ofte kombineret med oppumpning og recirkulation af grundvand. I forhold til passive systemer kræver aktive systemer mere materiel over jorden såsom pumper og rørføringer, injektionsudstyr og evt. automatisk kontrol- og monitoringsudstyr. Aktive systemer anvendes oftest i aflejringer med god hydraulisk ledningsevne som sand/grus-aflejringer, men de er også benyttet i sprækkede aflejringer. Fordelen ved aktive systemer er en bedre fordeling af tilsætningsstoffer i magasinet end for passive systemer. Dette bevirker en hurtigere og mere effektiv oprensning. De største ulemper ved aktive systemer er, at de ikke er velegnede i lavpermeable aflejringer. Herudover er driften af afværgeforanstaltninger typisk vanskeligere end for passive systemer.

Passive systemer består af én eller flere injektioner af donor i behandlingsområdet eller af indbygning af biobarrierer. Passive systemer er generelt simple og nemme at implementere. Driftsproblemer med tilklogning af borer er ligeledes mindre end for aktive systemer. I forhold til aktive systemer er passive systemer ikke så gode til at opnå den samme kontakt mellem elektrondonor, bakterier og de klørerede ethener. Oprensningseffekten er derfor typisk dårligere end for aktive systemer. Vurdering af erfaringerne med aktive og passive injektionssystemer lider under, at de data, der er tilgængelige for passive systemer, er af begrænset kvalitet.

#### Hydrogeologi

*In situ* anaerob deklorering som afværgeteknologi har hovedsagelig været anvendt i sandede grundvandsmagasiner, og der er på det seneste sket en stærk udvikling i anvendelsen i opsprækkede bjergarter (kalk, granit).

Vidensgrundlaget vedrørende oprensning i lavpermeable akviferer er ringe. De opnåede erfaringer tyder på, at man vil møde de samme problemer som alle andre teknikker på sådanne lokaliteter dvs. problemer med tilførsel og opblanding (kontakt med forureningen), besværlig monitorering, og lange tidshorisonter. Da forurening med klorerede opløsningsmidler i Danmark ofte er knyttet til lavpermeable aflejringer er der et behov for ved hjælp af pilotforsøg at afklare, om det er muligt at oprense lavpermeable aflejringer.

#### Redoxforhold

I litteraturgennemgangen har metoden fundet anvendelse både i anaerobe og aerobe magasiner. Markant ophobning af nedbrydningsprodukterne *cis*-DCE, VC og ethen sammen med stærkt reducerede forhold er gode indikationer på, at grundvandskemien på lokaliteten er gunstig for stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. På lokaliteter med aerobe forhold, hvor koncentrationen af nedbrydningsprodukter er ubetydelig, kan stimuleret *in situ* anaerob deklorering stadig være en velegnet metode. Tilvænningsperioden, før den anaerobe deklorering er effektiv, vil dog være længere end på lokaliteter med allerede anaerobe forhold. På aerobe lokaliteter vil behovet for tilsætning af bakterier (bioaugmentation) sandsynligvis også være større.

#### Elektrondonorer

Stoffer, der normalt benyttes som elektrondonorer, er laktatbaserede polymerer (HRC), oliebasebaserede langsomt frigivende forbindelser, opløselige forbindelser såsom sukkerstoffer (melasse), fødevarerbasebaserede syrer (acetat eller laktat), alkoholer (metanol eller ethanol) og andre naturligt forekomne materialer (kitin eller komposteret findelt træ/bark). Under anaerobe forhold er alle disse stoffer genstand for fermentering, hvorved der dannes hydrogen ( $H_2$ ). Der skelnes mellem opløste letomsættelige elektrondonorer og langsomtfrigivende elektrondonorer.

Sand- og grusmagasiner og sprækkede formationer som kalkmagasiner er ofte velegnede til aktiv tilsætning af opløste letomsættelige elektrondonorer såsom laktat, metanol, etanol og acetat. I lavpermeable aflejringer anvendes typisk langsomtfrigivende elektrondonorer som HRC, vegetabiliske olier eller emulgeret sojabønneolie.

Der kan generelt ikke udpeges nogle elektrondonorer, som på forhånd kan siges at være bedre end andre, da mange elektrondonorer har vist sig at være velegnede. For at sikre et procesmæssigt optimalt donorvalg foreslås det derfor, at der med det nuværende erfaringsgrundlag gennemføres laboratorieforsøg med donorer, som er potentielle kandidater på den givne lokalitet. Disse forsøg kan også belyse donorforbruget på den givne lokalitet. Den største usikkerhed omkring behovet for elektron donor er knyttet til mængden af biologisk tilgængeligt jern. Der er i litteraturen meget lidt fokus på den problemstilling, men samtidig er der i mange feltprøvninger rapporteret om høje koncentrationer af opløst jern. Uanset om jern har signifikant betydning som elektronacceptor, er det værd at bemærke, at det samlede elektron donor behov typisk er betydeligt lavere end de mængder af kemiske oxidationsmidler, som tilsættes ved fx kemisk oxidation.

#### Tilsætning af bakterier (bioaugmentation)

Mange af pilot- og fuldskaloprensninger indikerer, at det er nødvendigt at tilsætte bakteriekultur for at få en fuldstændig nedbrydning til ethen, idet nedbrydningen ofte standser ved *cis*-DCE uden tilsætning af bakterier.

Den anden væsentlige diskussion er, om det er en fordel at tilsætte yderligere bakterier til et system, hvor der sker anaerob deklorering til ethen. Det kan der ikke svares entydigt på i dag, da der vides for lidt om bakteriernes evne til at vokse under feltforhold i forhold til eksisterende bakterier. Litteraturgennemgangen indikerer, at det er en fordel i form af en hurtigere nedbrydning. Dette kan være et meget vigtigt argument, da tidshorisonten i oprensningen måske kan mindskes.

#### Oprensningseffekt og tidshorisont

De bedste oprensningseffekter er fundet på aktive systemer med anvendelse af bioaugmentation. Her er det lykkedes at oprense til under 10 µg/l for summen af klorerede opløsningsmidler.

I litteraturen er der få rapporter om afsluttede sager, herunder nødvendige tidshorisonter for en oprensning. De hurtigste oprensninger er fundet ved aktive systemer med anvendelse af bioaugmentation, mens de langsomste oprensninger er fundet ved passive oprensninger i lavpermeable aflejringer. Det er dog meget sandsynligt, at tidsforløbene med det nuværende stade af stimuleret *in situ* anaerob deklorering vil være flere år, så der er ikke tale om en revolution i effektiviteten af oprensning af klorerede opløsningsmidler i forhold til andre *in situ* metoder. Metoden vurderes at have et betydeligt udviklingspotentiale, hvis der forsat sker en målrettet udvikling og anvendelse af metoden i Danmark og i udlandet.

#### Spredning og overlevelse af bakterier

Risikoen ved injektion af bakterier anses for at være ubetydelig, hvis de procedurer, der er udviklet i Nordamerika, overholdes. Umiddelbart er det største problem risikoen for injektion af patogene mikroorganismer, hvilket skal sikres ved attester på, at bakteriekulturene er testet og fundet fri for patogener. Det skal understreges, at de kendte bioaugmentation teknikker benytter sig af bakterier, som er opformeret på baggrund af naturligt forekommende bakterier. Der er altså ikke tale om genetisk manipulerede bakterier (GMO).

Et hyppigt spørgsmål er muligheden for spredning og overlevelse af de injicerede bakterier. Bakterierne kan transporteres i akviferer, hvilket nærmest er en forudsætning for, at de kan anvendes til bioaugmentation. Spredningshastigheden er formentlig langsommere end den naturlige grundvandstrømningshastighed. *Dehalococcoides*'s overlevelse i akviferer er ikke velundersøgt. Det forventes ikke, at der sker en stærk vækst af bakterierne udenfor områder forurenet med klorerede opløsningsmidler. Kulturen henfalder eller dør formentlig under aerobe forhold, men vidensniveauet er meget sparsomt.

#### Forslag til undersøgelsesprogram

I forhold til de nuværende danske forureningsundersøgelser er der i fremtiden behov for at måle ethen og ethan som standard i grundvandet. Bestemmelse af det organiske stof i sedimentet anbefales også at indgå som standard. Desuden er der behov for at bestemme redoxforholdene. Merudgifterne til disse undersøgelser vil være relativ små, under forudsætning af, at disse udføres samtidig med de andre undersøgelser, som i forvejen foretages i en videregående undersøgelse.

#### Økonomi

I forhold til andre oprensningemetoder som airsparging, kemisk oxidation og afværgepumpning vurderes stimuleret reduktiv deklorering at være

konkurrencedygtig. Det vil dog afhænge af en konkret vurdering på den enkelte sag.

### Lovgivning

Tilsætning af bakterier og substrat til grundvandet samt en eventuel recirkulering af bakterieholdigt grundvand kræver i Danmark normalt en tilladelse i henhold til miljøbeskyttelseslovens § 19, stk. 1. Amtet er tilladelsesmyndighed i henhold til § 19, stk. 4. Krav til eventuel monitoring vil blive fastlagt af amtet i forbindelse med tilladelsen og indgå som et vilkår i denne. Dog gælder i henhold til jordforureningslovens § 63, at hvis der er tale om undersøgelser eller afværgeprojekter i forbindelse med den offentlige indsats, kan disse gennemføres uden tilladelse efter bl.a. miljøbeskyttelsesloven og vandforsyningsloven. Det er en forudsætning, at der er tale om et egentligt afværge- eller undersøgelsesprojekt. Amtsrådet kan afgøre, hvorvidt en sag falder ind under den offentlige undersøgelses- og afværgeindsats.

### Udviklingsbehov

I forhold til mange andre oprensningsmetoder er stimuleret reduktiv deklorering forholdsvis kompliceret, da den udover de traditionelle arbejdsområder (hydrogeologi, forureningskemi, dimensionering og implementering) omfatter et meget betydende mikrobiel og geokemisk element, især efter at bioaugmentation (tilsætning af bakterier) indgår som en del af teknologien. Dette indebærer, at der er et behov for et samspil mellem myndigheder, forskere og rådgivere.

Nedenstående emner viser, hvor der er behov for udvikling af anaerob deklorering som afværgeteknologi på feltskala i Danmark:

- Veldokumenterede pilotforsøg, og fuldskala implementeringer, hvorunder valg og forbrug af donor vurderes
- Oprensning på lav permeable lokaliteter eller i umættet zone
- Oprensning af frie faser eller på grænsefladen mellem frie faser og forureningsfanen
- Håndtering og injektion af bakterier
- Vurdering af behov for bioaugmentation
- Laboratoriemetoder til vurdering af potentialet for anaerob deklorering og nedbrydningsrater
- Myndighedsgodkendelse af injektion af donor og bioaugmentation

Ved løsning af ovennævnte emner vil det være relevant at inddrage såvel danske som udenlandske rådgivere/forskere og danske myndigheder (Miljøstyrelsen og amter).

### Screening af lokaliteter

Der er udarbejdet en screeningsmodel til en indledende vurdering af oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på en given lokalitet. Modellen præsenterer en liste af kriterier til at vurdere anvendeligheden, og den tillægger en score for hvert kriterium. Kriterierne er organiseret i fire generelle kategorier: Forundersøgelser af lokaliteten/hydrogeologisk profil, forureningsprofil, geokemisk profil og logistiske faktorer. Kriterierne er vægtet i forhold til deres relevans. Kriterier, der sandsynliggør muligheden for brug af biologisk oprensning, er vægtet positivt, og kriterier, der reducerer muligheden, er vægtet negativt. Derudover er kriterier, der minimerer omkostningerne ved implementeringen vægtet positivt. De mest betydende faktorer i modellen er den hydrauliske ledningsevne og forekomst af nedbrydningsprodukter. En høj hydraulisk ledningsevne og forekomst af

vinylklorid og ethen/ethan giver høj score. Det har været målet, at modellen skal være relativ simpel, samt at modellen skal kunne anvendes på baggrund af det datagrundlag, som typisk findes ved danske videregående undersøgelser.

Modellen er i første omgang anvendt til at screene 13 lokaliteter på Fyn. Den gennemførte screening viser stor spredning på resultaterne mellem de enkelte lokaliteter, hvilket har gjort det nemt at udvælge de mest egnede lokaliteter til afprøvning af metoden. Selv om en lokalitet har fået en lav score, er det ikke ensbetydende med, at biologisk oprensning ikke kan være attraktiv som afværgemetode på den konkrete grund i forhold til andre teknikker. Det må dog forventes, at det vil være vanskeligere at oprense forureningen med metoden på disse lokaliteter, end på de lokaliteter, der har opnået en højere score.

Det vurderes, at modellen også kan anvendes i andre lignende sager med klorerede opløsningsmidler. Screeningsmodellen kan også anvendes som en tjekliste til at vurdere hvilke forhold man skal være opmærksom på, hvis biologisk oprensning overvejes som afværgemetode.

# Summary and Conclusions

This report highlights the possibility of applying stimulated *in situ* reductive dechlorination as a remediation technology on Danish sites polluted by chlorinated solvents. The project was carried out under the Danish Environmental Protection Agency's Technology programme of soil and groundwater pollution in cooperation with the County of Funen.

The project was carried out in cooperation between the Technical University of Denmark - Environment & Resources DTU, GeoSyntec Consultants and COWI A/S.

The project includes a collection of the knowledge of the subject available nationally and internationally. Additionally a screening model is developed for an initial assessment of remediation by means of stimulated *in situ* reductive dechlorination on a certain location. Initially the model will be applied for screening of 13 sites on Funen, all polluted by chlorinated solvents.

The project is confined to including the degradation of chlorinated ethenes and 1,1,1-TCA.

Literature review

## Reductive anaerobic dechlorination

Stimulated *in situ* reductive dechlorination is a remediation technology applied for sites polluted by chlorinated ethenes. The natural degradation processes in the groundwater system are stimulated by addition of electron donor and/or bacteria. At anaerobic dechlorination there will be a stepwise removal (substitution by hydrogen) of the chlorine atoms, so that from PCE there will be formation of TCE, *cis*-DCE, VC and finally ethene. Anaerobic dechlorination is a redox process, in which certain bacteria can use the chlorinated ethenes as electron acceptor for generation of energy in a respiration process often called dehalorespiration. Most dehalo-respiring bacteria use hydrogen as the primary electron donor at the dechlorination of chlorinated ethenes. The process may proceed naturally in polluted groundwater systems under reduced redox conditions, but will often be limited because of lack of electron donors.

A number of dehalo-respiring bacteria are able to dechlorinate PCE or TCE to *cis*-DCE, but today the only isolated bacterium known is, *Dehalococcoides ethenogens* 195 that can reductively dechlorinate PCE or TCE completely to ethene. The last dechlorination step from vinyl chloride to ethene takes probably place by cometabolic transformation and is not connected to dehalorespiration. *Dehalococcoides ethenogens* 195 belongs to the bacterial strain *Dehalococcoides*, which has the characteristics that it can carry out reductive dechlorination from *cis*-DCE to VC. In practice this is extremely important, as it means that the anaerobic dechlorination from PCE til *cis*-DCE can only be regarded as the first part of the process. The very presence of *cis*-DCE does consequently not prove that a complete degradation to vinyl chloride and ethene can take place on a certain location. Absence of *Dehalococcoides* means probably that anaerobic dechlorination from *cis*-DCE to VC does not take place.



### Application of stimulated *in situ* reductive dechlorination as a remediation technology

At application of stimulated *in situ* reductive dechlorination as a remediation technology, electron donors - often in the form of organic matter - and nutrients are added to the saturated zone. At fermentation of the electron donor there is a generation of hydrogen, which is used in the reductive dechlorination. Addition of electron donors alone (without addition of bacteria) is called "biostimulation". If a bacterial culture is added simultaneously, it is called "bioaugmentation".

The majority of experience with the method in pilot and full-scale has been achieved in North America. There are however some activities in Holland, but in the international literature there are but few publications from there. In Denmark there is only one example of field experience in terms of a pilot test.

The method can be used on both chlorinated ethenes and 1,1,1-TCA. Removal of the free phase is always recommended prior to remediation by stimulated *in situ* reductive dechlorination. On the basis of laboratory tests it seems there is a potential for stimulation of degradation of free phases or on the contact surface between free phases and the pollution plume. This is a significant research field and is at present investigated in pilot tests in the field in North America.

As stimulated *in situ* reductive dechlorination involves addition of electron donors and fermentation substrates to groundwater, this technology is so far only applicable for treatments in the saturated zone.

### Remediation principles

Field techniques used for stimulated *in situ* reductive dechlorination involve both active and passive systems.

Active systems use constant or pulsating addition of electron donors - often combined with pumping and recirculation of groundwater. Compared to passive systems, active systems require more equipment on the surface, such as pumps and pipings, injection equipment and automatic control and monitoring equipment. Active systems are most often used in deposits with good hydraulic conductivity, such as sand/gravel deposits, but they are also used in fissured deposits.

The advantage of active systems is a better distribution of addition agents in the aquifer compared to the passive systems. This means a shorter and a more efficient treatment time. The largest disadvantages of active systems are that they are not suitable for low-permeable deposits. Additionally the operation of remediation systems is typically more difficult than that of the passive systems.

Passive systems include one or more injections of donor in the treatment area or of biobarriers. Passive systems are generally simple and easy to implement. The risk of operational problems and clogging of bore holes is less significant than in connection with active systems. In comparison to active systems, passive systems are godless efficient at achieving the same contact between electron donor, bacteria and the chlorinated ethenes. The treatment effect is therefore inferior to that of the active systems. When assessing the experience with active and passive injection systems, it should be considered that the data of passive systems collected are of inferior quality.

### Hydrogeology

*In situ* anaerobic dechlorination as a remediation technology has mainly been

used in sandy aquifers, and lately there has been a rapid development in the application in fractured rock types (lime, granite). The knowledge basis regarding treatment of low-permeable aquifers is poor. The gained experience indicates that the same problems as with other techniques are to be expected on such sites, i.e. problems with addition and mixing (creating contact with the pollution), difficult monitoring and distant time horizons. As pollution with chlorinated solvents in Denmark is often related to low-permeable deposits, it is necessary to clarify - by means of pilot tests - the possibility of remediation of low-permeable deposits.

#### Redox conditions

At the review of literature it was found that the method has been applied in both anaerobic and aerobic aquifers. A significant accumulation of the degradation products *cis*-DCE, VC and ethene together with considerably reduced conditions are true indications that the groundwater chemistry on the location is favourable for *in situ* reductive dechlorination. On sites with aerobic conditions, where the concentration of degradation products is insignificant, stimulated *in situ* anaerobic dechlorination might still be a suitable method. The adaptation period, before the anaerobic dechlorination is effective, will however be longer than that on sites with already anaerobic conditions. On aerobic sites the need for addition of bacteria (bioaugmentation) will probably also be higher. Prior to bioaugmentation it is important that reducing conditions have been obtained as exposure to oxygen might harm the bacteria.

#### Electron donors

Substances normally used as electron donors are lactate-based polymers (HRC), oil-based slow-releasing compounds, soluble compounds such as molasses, foodstuff-based acids (acetate or lactate), alcohols (methanol or ethanol) and other naturally occurring materials (chitin or composted wood/bark debris). Under anaerobic conditions all these materials are subjected to fermentation, at which hydrogen ( $H_2$ ) is generated. It is distinguished between dissolved, easy-reacting electron donors and slow-releasing electron donors.

Sand and gravel aquifers and fissured structures such as lime aquifers are often suitable for active addition of dissolved, easy-reacting electron donors, such as sodium lactate, methanol, ethanol and acetate. In low-permeable deposits are typically used slow-releasing electron donors, such as HRC, vegetable oils or emulsified soya bean oil.

Generally there are no electron donors that can in advance be pointed out as being better than others, as many electron donors have turned out to be suitable. In order to ensure an optimal donor selection as regards the process, it is suggested - on the present experience base - to carry out laboratory tests with donors that are potential candidates on the location in question. These tests would also highlight the donor consumption on the location in question. The most significant uncertainty as to the need for electron donor is connected to the volume of biologically accessible iron. In literature there is little focus on this problem, but at the same time high concentrations of dissolved iron has been reported at many field tests. Irrespective of the fact that iron has significant importance as electron acceptor, it is worth noticing that the total electron donor requirements are typically lower than the quantities of chemical oxidants added at e.g. chemical oxidation.

### Bacterial addition (bioaugmentation)

Many of the pilot and full-scale remediation projects indicate that it is necessary to add bacterial culture to obtain a complete dechlorination to ethene, as the dechlorination often stop at *cis*-DCE without addition of bacteria.

Another significant discussion is whether it would be advantageous to add more bacteria to a system, where anaerobic dechlorination to ethene takes place. Today there is no answer to this question, as too little knowledge is available on the ability of the bacteria to grow under field conditions compared to existing bacteria. The literature review indicates that there is an advantage in the form of a faster degradation. This would be a very important argument, as it might be possible to reduce the time horizon of the treatment.

### Treatment effect and time frame

The best remediation effects were found at active systems under application of bioaugmentation. Here, a remediation effect below 10 µg/l of the sum of chlorinated solvents was achieved.

In literature there are few reports on completed cases that include the necessary time horizons of treatment. The fastest treatment were found at active systems under application of bioaugmentation, whereas the slowest treatment were found using passive systems in low-permeable deposits. It is however probable that the time at the present stage of stimulated *in situ* anaerobic dechlorination will be several years, so there has been no revolution in the efficiency of the remediation of chlorinated solvents compared to other in situ methods. The method is assessed to have a considerable development potential, if the applied development and the application of the method in Denmark and abroad continue.

### Spreading and survival of bacteria

The risk at injection of bacteria is considered insignificant, if the procedures developed in North America are followed. Immediately the greatest problem is the risk of injection of pathogenic microorganisms, which is to be ensured by means of certificates stating that the bacterial cultures have been tested and found free of pathogens. It is stressed that the known bioaugmentation techniques use bacteria, which are enriched on the basis of naturally occurring bacteria. That is to say they are not genetically manipulated bacteria (GMO).

A frequently asked question concerns the risk of spreading and survival of the injected bacteria. The bacteria can be conveyed in aquifers - actually a condition for the use in connection with bioaugmentation. The speed of the spreading is probably lower than the speed of the natural groundwater flow. *Dehalococcoides*' survival in aquifers has not been thoroughly investigated. A heavy growth of the bacteria outside areas polluted by chlorinated solvents is not expected. The culture will probably disintegrate or die under aerobic conditions, but the level of knowledge is very sparse.

### Proposal for an investigation scheme

Compared to the present Danish pollution investigations there will in future be a need for measuring ethene and ethane in the groundwater as a standard. It is also recommended to include a determination of the organic matter in the sediment as a standard. Additionally there is a need for determination of the redox conditions. The supplementary costs for these investigations will be relatively low - under the precondition that they are carried out simultaneously with the other investigations.

### Economy

Compared to other remediation methods, such as air sparging, chemical oxidation and preventive pumping, stimulated reductive dechlorination is considered competitive. It would however depend on a specific assessment of the individual case.

### Legislation

Addition of bacteria and substrate to the groundwater and a possible recirculation of bacteria-containing groundwater will in Denmark normally require an authorization according to the Environmental Protection Act's § 19, 1. The county is the authorizing authority according to § 19, 4. Requirements of a possible monitoring will be determined by the county in connection with the authorization and be included in the authorization as a condition. It is however stipulated in § 63 of the Land Pollution Act that in cases of public investigations or preventive efforts, these can be carried out without authorization according to e.g. the Environmental Protection Act and the Water Supply Act. It is a precondition that it concerns an actual preventive or survey project. The County Council decides whether a case is acceptable as public survey and preventive efforts.

### Development needs

Compared to many other remediation methods stimulated reductive dechlorination is relatively complicated, as it - in addition to the traditional fields of activity ( hydrogeology, pollution chemistry, dimensioning and implementation) involves a significant microbial and geochemical element, especially after that bioaugmentation (addition of bacteria) has become part of the technology. This means that there is a need for cooperation between authorities, researchers and consultants.

The below topics show where there is a need for development of anaerobic dechlorination as preventive technology on field scale in Denmark:

- Well-documented pilot tests and full-scale implementations, including an assessment of choice and consumption of donor
- Remediation of low-permeable sites or in unsaturated zone
- Remediation of free phases or on the contact surface between free phases and the pollution plume
- Handling and injection of bacteria
- Assessment of need for bioaugmentation
- Laboratory methods for assessment of anaerobic dechlorination potential and rates of degradation
- Authorities' approval of injection of donor and bioaugmentation

In connection with the solution of the above topics it would be relevant to involve both Danish and foreign consultants/researchers and Danish authorities (the Danish EPA).

### Screenings of sites

A screening model has been prepared for an initial assessment of remediation by means of stimulated *in situ* reductive dechlorination on a certain location. The model presents a list of criteria for an assessment of the applicability, and it adds a score for each criterion. The criteria are organised in four general categories: Preliminary investigations of the location/hydrogeological profile, pollution profile, geochemical profile and logistic factors. The criteria are weighted according to their relevance. Criteria rendering probable the use of

stimulated *in situ* reductive dechlorination are weighted positively, and criteria reducing the possibility are weighted negatively. Additionally, criteria minimizing the costs of the implementation are weighted positively. The most important factors in the model are the hydraulic conductivity and presence of degradation products. A high hydraulic conductivity and presence of vinyl chloride and ethene/ethane result in a high score. The aim was a model that is relatively simple, and that it must be applicable on the basis of the data typically found at Danish extensive/successive investigations.

The results generated by the model serve solely as an indication of the possibility of stimulation of the reductive dechlorination - and are consequently not to be used instead of investigations on the applicability in the field. The model presupposes that the mother product is only PCE or TCE.

The model has initially been used for screening of 13 sites on Funen that are all polluted by chlorinated solvents. The screenings show a considerable variance among the individual sites. Thus it has been relatively easy to select the most suitable sites.

When a location has achieved a low score, it does not mean that stimulated *in situ* reductive dechlorination cannot be attractive as a remediation method on the concrete location compared to other techniques. It must be expected however that it would be more difficult to treat the pollution by means of the method in question.

# 1 Indledning

## 1.1 Baggrund

Denne rapport belyser muligheden for at anvende stimuleret *in situ* reduktiv deklorering som afværgeteknologi i forhold til danske lokaliteter, der er forurenede med klorerede opløsningsmidler. Projektet er udført under Miljøstyrelsens Teknologiprogram for jord- og grundvandsforurening i samarbejde med Fyns Amt.

Projektet er opdelt i 2 hoveddele:

1. Vidensindsamling (både nationalt og internationalt) om stimuleret *in situ* reduktiv deklorering
2. Udvikling af en screeningsmodel til en indledende vurdering af mulighed for brug af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på en given lokalitet

## 1.2 Formål

Teknologiprojektets overordnede formål er at få belyst anvendeligheden af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering som afværgeteknologi i forhold til danske lokaliteter, der er forurenede med klorerede opløsningsmidler.

## 1.3 Dataindsamling

### 1.3.1 Anvendt litteratur

Den videnskabelige litteratur er søgt via DTVs artikeldatabase samt databasen ISI-Web of Knowledge. Den fundne litteratur (254 referencer) er samlet i en elektronisk database lavet i programmet Reference Manager version 10. Databasen indeholder hovedsageligt litteratur publiceret i internationale videnskabelige tidsskrifter, dvs. artikler der inden publikation er kritisk gennemlæst (peer reviewet) af eksterne forskere. Den elektroniske database er søgbar, og for hver artikel findes et abstrakt og tilhørende nøgleord. Databasen er tilgængelig fra <http://www.er.dtu.dk/research/cs/links.htm>.

Der findes kun få videnskabelige artikler til beskrivelse af erfaringer om feltforsøg, økonomi og risikovurderinger. Der er derfor indhentet supplerende viden fra øvrige artikler, og rapporter m.v. (grå litteratur). Dette inkluderer konference-proceedings fra fx Batelle konferencer, andre europæiske og nordamerikanske konferencer og danske møder, samt en række rapporter udgivet af Miljøstyrelsen i Danmark og USA. Da der er store kvalitetsforskelle i denne litteratur, er der efter en faglig bedømmelse sket en udvælgelse af de mest relevante artikler og rapporter.

### 1.3.2 Skemaer med nøgleinformationer

De væsentligste oplysninger om de enkelte artikler (både videnskabelige artikler, og andre artikler) er samlet i 2 skemaer i appendiks A. Litteratur om laboratorieundersøgelser fremgår af appendiks A1 og litteratur om feltundersøgelser af appendiks A2. I skemaerne er der medtaget 52 videnskabelige artikler og 65 artikler fra den øvrige litteratur.

I skemaerne er anført relevante forhold omkring geologi, forureningskomponent, design, elektrondonor, bakteriekultur, temperatur mm. Herudover er der en sammenfatning af de væsentligste konklusioner (key findings) for de enkelte artikler.

### 1.3.3 Anden videnindsamling

For at indhente erfaringer om myndighedsforhold ved stimuleret *in situ* reduktiv deklorering, er der indhentet oplysninger fra en række myndigheder i Danmark og i udlandet. Oplysninger vedrørende disse henvendelser fremgår af oversigten over referencer i afsnit 10.2.

Herudover har GeoSyntec indhentet oplysninger om myndighedsbehandlingen i Nordamerika, herunder:

- Den Amerikanske Miljøstyrelse (USEPA)
- Den Canadiske Miljøstyrelse (Environment Canada)
- Statsmyndighederne i Californien og Florida

Desuden er der indhentet oplysninger fra udenlandske firmaer (oversigt i afsnit 10.2), som har erfaringer med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. Specifikt har firmaet Bioclear bidraget med en rapport om forholdene i Holland (appendiks G).

## 2 Nedbrydning af klorerede ethener samt 1,1,1-triklorethan

Der er flere processer, der har betydning for klorerede stoffers skæbne i naturen, hvor de væsentligste er transport, fordampning, sorption og nedbrydning. Ved de fleste af disse processer overføres stoffet fra en fase til en anden, uden at stoffet bliver mindre skadeligt eller at den absolutte mængde reduceres. Nedbrydning er derimod karakteriseret ved, at stoffet undergår en vis forandring til andre stoffer. Der skelnes mellem fuldstændig nedbrydning eller transformation af et organisk stof. Ved en fuldstændig nedbrydning omdannes det organiske stof til kuldioxid, vand og salte, mens stoffet ved transformation blot omdannes til et nedbrydningsprodukt, som kan være stabilt eller omdannes videre.

I de følgende afsnit beskrives mulige nedbrydningsprocesser for klorerede ethener og 1,1,1-TCA, samt under hvilke redoxforhold processerne forløber. Endvidere præsenteres de mikroorganismer, der kan nedbryde klorerede stoffer ved reduktiv deklorering, da denne nedbrydningsproces har vist sig at være en potentiel metode til oprensning af grunde forurenet med klorerede opløsningsmidler.

Klorerede ethener samt 1,1,1-triklorethan, er afledt af henholdsvis ethen ( $H_2C=CH_2$ ) og ethan ( $H_3C-CH_3$ ) ved substitution af hydrogen med klor. I tabel 2.1 er angivet de vigtigste kemiske og fysiske konstanter for de klorerede ethener samt 1,1,1-triklorethan. I tabel 2.1 er endvidere angivet forkortelser for de forskellige stoffer, der vil blive anvendt i resten af rapporten. Generelt er de klorerede ethener og ethaner karakteriseret ved at være flygtige (høj Henry's konstant) og have en relativ høj opløselighed i vand. Stofferne har med undtagelse af vinylklorid alle en densitet, der er højere end vands, og betegnes som DNAPLs (Dense Non-Aqueous Phase Liquids), hvilket betyder, at hvis stofferne forekommer i fri fase i jord eller grundvand, vil de synke nedad igennem grundvandsspejlet og ned i grundvandszonen til de når et impermeabelt lag. De klorerede ethener har desuden relativt lave  $K_{ow}$ -værdier, hvilket betyder, at stofferne kun i mindre grad tilbageholdes ved sorption til jorden. I grundvandsmagasiner med lavt organisk indhold vil stofferne på grund af deres høje opløselighed og mobilitet spredes med grundvandet, hvorved der kan dannes en forureningsfane.



Tabel 2.1. Fysisk-kemiske data for klorerede ethener samt 1,1,1-triklorethan. Alle data er fra Miljøstyrelsen, 1996 og gældende ved 25°C.

Stof	Tetraklorethylen	Trikllorethylen	<i>cis</i> -diklorethylen	Vinylklorid	1,1,1-triklorethan
Forkortelse	PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	VC	1,1,1-TCA
CAS nr.	127-18-4	79-01-6	156-59-2	75-01-4	71-55-6
Kemisk formel	Cl <sub>2</sub> C=CCl <sub>2</sub>	Cl <sub>2</sub> C=CHCl	HCIC=CHCl	HCIC=CH <sub>2</sub>	Cl <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub>
Molvægt (g/mol)	165,83	131,39	96,94	62,5	133,41
Abs.viskositet (cP)	1,932	0,566	0,444	-	0,903
Densitet (kg/l)	1,63	1,47	1,27	0,92	1,35
Damptryk (Pa)	2415	9900	27000	354600	16500
Vandopløselighed (mg/l)	240	1400	3500	2763	1250
Fordelingskoef. mellem luft og vand (dim.løs)	0,72	0,39	0,17	1,1	0,70
Log K <sub>ow</sub>	2,88	2,53	1,86	1,38	2,49

I rapporten anvendes typisk µg/l og µmol/l som enhed for koncentration af de klorerede opløsningsmidler. Omregning fra µmol/l til µg/l fremgår af tabel 2.2.

Tabel 2.2 Omregning fra µmol/l til µg/l

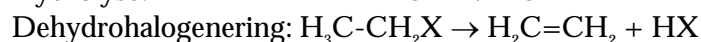
Stof	PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	VC	1,1,1-TCA
1 µmol/l svarer til	165,8 µg/l	131,4 µg/l	96,9 µg/l	62,5 µg/l	133,4 µg/l

## 2.1 Nedbrydningsprocesser

Klorerede alifatiske hydrocarboner kan nedbrydes eller transformeres under naturlige forhold via kemiske eller biologiske processer.

### ***Abiotiske nedbrydningsprocesser***

Nedbrydning, hvor mikroorganismer eller enzymer ikke er involveret, betegnes abiotisk eller kemisk nedbrydning. Abiotisk omsætning fører sjældent til fuldstændig nedbrydning, og i nogle tilfælde er omsætningsprodukterne mere toksiske end udgangsproduktet. Abiotisk nedbrydning af klorerede organiske stoffer kan ske ved hydrolyse og dehydrohalogenering. Ved hydrolyse erstattes en halogensubstituent med en hydroxyl (OH<sup>-</sup>)-gruppe. Dehydrohalogenering er en proces, der involverer halogenerede alkaner. Ved dehydrohalogenering fjernes et halogen fra kulstofatomet, hvorefter der fjernes et hydrogenatom fra nabo carbonatomet, hvilket medfører dannelse af en alken. Sandsynligheden for, at en halogeneret forbindelse vil nedbrydes ved hydrolyse, mindskes med stigende antal halogener tilknyttet molekylet. Ved dehydrohalogenering øges nedbrydningen derimod med antallet af halogener.



Klorerede ethener nedbrydes ikke i væsentlig grad ved hydrolyse (Butler og Barker, 1996). Klorerede metaner og ethaner kan derimod nedbrydes ved hydrolyse, selvom nedbrydningshastighederne generelt er lave. Vogel (1994) rapporterer om halveringstider for abiotisk nedbrydning af monohalogenerede alkaner i en størrelsesorden på dage til måneder, mens halveringstider for

polyhalogenerede metaner og ethaner kan være op til flere tusinde år. En undtagelse er dog 1,1,1-triklorethan, der omdannes dels til 1,1-DCE ved elimination og dels til eddikesyre ved hydrolyse samt til klorethan. Klorethan omdannes til ethanol ved hydrolyse (McCarty, 1996). Halveringstiden for abiotisk nedbrydning af 1,1,1-TCA er ca. 1-2 år (Vogel og McCarty, 1987; Jeffers et al., 1989). Andre polyklorerede ethaner som 1,1,2-TCA kan også nedbrydes abiotisk ved dehydrohalogenering til 1,1-DCE, mens tetraklorethan og pentaklorethan kan nedbrydes til henholdsvis TCE og PCE (Jeffers et al., 1989).

Abiotisk nedbrydning af klorerede stoffer kan under stærkt reducerede forhold ske ved reduktiv deklorering, hvorved der fraspaltes klorsubstituent. Visse reaktive metaller kan katalysere nedbrydning af klorerede stoffer. Reaktive metaller kan være tilstede som organiske forbindelser fx komplekserede porphyriner eller som uorganiske forbindelser i jordmatricen. Sådanne processer er kemisk komplekse og ikke velundersøgte. Generelt regnes kemisk omsætning af klorerede ethener i grundvandssystemer for værende af mindre betydning pga. den relativt langsomme nedbrydning sammenlignet med biologiske nedbrydningsprocesser.

### ***Biologiske nedbrydningsprocesser***

Bakteriers metabolisme er baseret på redoxreaktioner, dvs. reaktioner, hvor der sker en udveksling af elektroner. Nogle bakterier har gennem tiden udviklet evnen til at oxidere eller reducere klorerede organiske stoffer ved at bruge dem som enten elektrondonor eller elektronacceptor. Bakterier kan drage nytte af at omsætte klorerede organiske stoffer på to måder:

- ved at bruge dem som kulstof- og energikilde ved tilstedeværelse af en brugbar elektronacceptor, hvorved kulstofskelettet oxideres fuldstændigt til kuldioxid
- ved at anvende de klorerede organiske stoffer som terminal elektronacceptor i energidannende processer

Udover energigivende og koblede redoxreaktioner kan andre enzymmedierede mekanismer som hydrolyse eller hydrogenation også bidrage til nedbrydning af klorerede organiske stoffer. Flere klorerede stoffer kan omsættes ved cometabolisme under både anaerobe og aerobe forhold. Ved cometabolsk nedbrydning reagerer de klorerede stoffer med enzymer involveret i bakteriernes metabolisme. Bakterierne får intet udbytte af reaktionen, og for opretholdelse af vækst kræves tilstedeværelse af et primærsubstrat. I nogle tilfælde kan reaktionen med de klorerede stoffer danne produkter, der er skadelige for bakterierne. Klorerede stoffer, der er svært nedbrydelige, kan ofte nedbrydes cometabolsk.

Mikrobielle nedbrydningsprocesser for klorerede ethener og ethaner inkluderer reduktiv deklorering, aerob cometabolsk nedbrydning og direkte oxidation. Under anaerobe forhold kan klorerede stoffer nedbrydes ved reduktiv deklorering enten co-metabolsk eller i en energigivende proces ofte kaldet halo-respiration. Direkte oxidation kan forløbe under både anaerobe og aerobe forhold. Tabel 2.3 viser en oversigt over de mulige mikrobielle nedbrydningsmekanismer for udvalgte klorerede ethener og ethaner.

Tabel 2.3. Mikrobielle nedbrydningsmekanismer for udvalgte klorerede ethener og ethaner

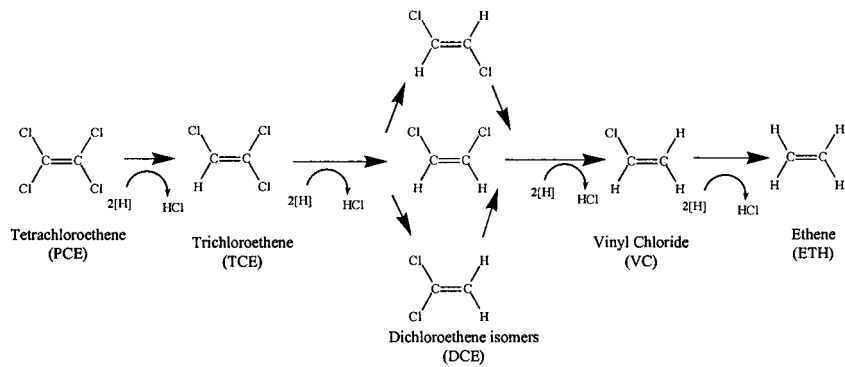
Kemisk forbindelse	Forkortelse	Halorespiration	Direkte aerob oxidation	Direkte anaerob oxidation	Aerob cometabolisme	Anaerob cometabolisme
Perklorethen	PCE	X				X
Triklorethen	TCE	X			X	X
1,2-diklorethen	1,2-DCE	X	X	X	X	X
Vinylklorid	VC	X	X	X	X	X
Triklorethan	1,1,1-TCA	X			X	X
1,2-diklorethan	1,2-DCA	X	X		X	X
Klorethan	CA		X		X	

I jord- og grundvandssystemer vil abiotisk omsætning af klorerede stoffer ofte være begrænset og nedbrydningen vil overvejende forløbe via mikrobielle processer. Følgende afsnit giver et overblik over de mulige biologiske nedbrydningsprocesser for klorerede ethener samt 1,1,1-TCA i grundvandsmiljøet.

### 2.1.1 Reduktiv deklorering

Klorerede stoffer er relativt oxiderede som følge af tilstedeværelsen af de elektronegative kloratomer, hvilket medfører, at de kan agere som elektronacceptorer i redoxprocesser. Ved tilstedeværelsen af en elektrondonor samt en katalysator kan hydrogen substituere klorid ved en proces kaldet reduktiv deklorering. Ved reduktiv deklorering fjernes trinvis et kloratom ad gangen. Figur 2.1 viser nedbrydningsvejen for sekventiel reduktiv deklorering af PCE til ethen. Yderligere kan ethen omdannes til ethan under anaerobe forhold (deBruin et al., 1992). Ved biologisk reduktiv deklorering af TCE dannes hovedsageligt *cis*-DCE. Tendensen for klorerede ethener til at undergå deklorering mindskes teoretisk set med lavere antal af kloratomer (Vogel et al., 1987). PCE er med fire kloratomer en relativt stærk oxidant og vil derfor let reduktivt dekloreres til TCE under anaerobe forhold. Oxidationstrinnet for kulstofatomerne i PCE er +2, mens oxidationstrinnet for kulstofatomerne i ethen bliver -2 (se også afsnit 3.4).

Reduktiv deklorering af TCE til *cis*-DCE kan foregå under Fe(III)-reducerende forhold samt under mere reducerende forhold. Reduktiv deklorering af *cis*-DCE til VC kan forløbe under sulfat-reducerende forhold (Vogel et al., 1987; Chapelle, 1996), men forløber hurtigere under metanogene forhold. Vinylklorid er den mest reducerede forbindelse af de klorerede ethener, og som følge heraf er reduktiv deklorering af VC til ethen signifikant langsommere og er kun betydende under stærkt reducerende metanogene forhold (Vogel and McCarty, 1985; DiStefano et al., 1991; Ballapragada et al., 1997; Maymo-Gatell et al., 1999). Reduktiv deklorering er den eneste mulige nedbrydningsvej for PCE.



Figur 2.1. Sekventiel reductiv deklorering af PCE.

Reduktiv deklorering kan forløbe ved en metabolisk energiproducerende proces eller ved en cometabolisk proces. Visse bakterier er i stand til at bruge klorerede forbindelser som terminal elektronacceptor og udnytte energien i en proces kaldet halorespiration eller dehalorespiration. Flere halorespirerende bakterier kan deklorere PCE eller TCE til *cis*-DCE, men der er til dato kun isoleret én bakterie *Dehalococcoides ethenogens 195*, der reductivt kan deklorere PCE fuldstændigt til ethen. Anaerob nedbrydning af PCE til ethen er dog observeret i flere laboratorieforsøg med blandingskulturer beriget på enkelte substrater samt ved feltundersøgelser på forurenede lokaliteter (se afsnit 2.3).

Udover de klorerede ethener kan 1,1,1-TCA og 1,2-DCA også nedbrydes ved halorespiration (Mayó-Gatell et al., 1999). Nedbrydningen af 1,1,1-TCA forløber over 1,1-DCA til CA (Adamson og Parkin, 2000; Sun et al., 2002) og formentlig til ethan (Dick et al., 2001). Undersøgelse af nedbrydningsvejen for 1,1,1-TCA besværliggøres dog af stoffets hurtige abiotiske nedbrydningshastighed, som gør det vanskeligt at skelne mellem biotisk og abiotisk nedbrydning (Wiedemeier et al., 1999).

Visse acetogene og metanogene bakterier kan cometabolisk deklorere PCE. Generelt deklorerer de acetogene bakterier PCE med en højere rate end de metanogene bakterier. Forsøg med metanogene og acetogene bakterier indikerer, at de observerede dekloreringsrater generelt er lave sammenlignet med rater observeret med halorespirerende bakterier (Middeldorp et al., 1999). Endvidere fjernes sædvanligvis kun et halogenatom. Fuldstændig deklorering af PCE til ethen i renkulturer af acetogene og metanogene bakterier er ikke observeret (Middeldorp et al., 1999).

Som følge af en faldende tendens til reductiv deklorering for de lavere klorerede ethener skulle man forvente at se akkumulering af VC på forurenede lokaliteter. På mange lokaliteter ses *cis*-DCE imidlertid at være tilstede i en højere koncentration end VC, hvilket kan skyldes, at VC transporteres til andre zoner, hvor det nedbrydes ved direkte oxidation enten under anaerobe eller aerobe forhold (se afsnit 2.1.3). Akkumulering af *cis*-DCE efter nedbrydning af PCE eller TCE kan også skyldes, at de rette halorespirerende bakterier enten ikke er tilstede, er begrænset af ufavorable redoxforhold eller af mangel på elektrondonor (se afsnit 3.2).

### 2.1.2 Cometabolsk oxidation under aerobe forhold

Under aerobe forhold kan en række klorerede stoffer omsættes ved cometabolsk nedbrydning. Wilson og Wilson (1985) var de første som observerede at metanotrofe bakterier var i stand til at nedbryde TCE til kuldioxid under aerobe forhold. Siden er det vist, at en bred vifte af aerobe bakterier kan oxidere TCE, DCE og VC til kuldioxid. Disse inkluderer metan-, propan-, ethen, aromat-, og ammoniumoxiderende bakterier (Alvarez-Cohen og Speitel, 2001). Også 1,1,1-TCA, 1,2-DCA og 1,1-DCA kan nedbrydes cometabolsk, selvom nedbrydningen af 1,1,1-TCA er mere begrænset og forløber langsommere sammenlignet med TCE (Alvarez-Cohen og Speitel, 2001). Generelt falder nedbrydningshastigheden med stigende antal kloratomer indenfor en serie af klorerede stoffer (ethaner, ethener og metaner). For diklorethenerne har placeringen af kloratomerne i forhold til dobbeltbindingen også en betydning fx nedbrydes 1,1-DCE væsentlig langsommere end *cis/trans*-DCE (Alvarez-Cohen og Speitel, 2001). Fuldt klorerede stoffer som PCE nedbrydes ikke cometabolsk under aerobe forhold.

Nedbrydningsvejen af ethener under aerobe forhold er kun undersøgt for TCE med metanotrofe bakterier. Det første trin er en epoxidering af TCE til TCE-epoxid, der udføres af de metanotrofe bakterier. TCE-epoxidet er meget reaktivt og omdannes hurtigt til forskellige C<sub>1</sub>- eller C<sub>2</sub>-forbindelser som organiske syrer, der mineraliseres til kuldioxid af metanotrofe eller heterotrofe bakterier (Uchiyama, 1992; Fox et al., 1990; Little et al., 1988). Nedbrydningen af de øvrige ethener forløber sandsynligvis også via et epoxid. Nedbrydning af 1,1,1-TCA forløber via 2,2,2-triklorethanol (Oldenhuis et al., 1989), som sandsynligvis nedbrydes videre til kuldioxid af heterotrofe bakterier. Generelt er cometabolsk oxidation en relativ hurtig proces.

Et fælles karakteristika for de aerobe bakterier, der cometabolsk kan nedbryde klorerede stoffer, er det uspecifikke enzym oxygenase, der katalyserer det første trin i nedbrydningen. Ved cometabolsk nedbrydning opnår bakterien hverken energi eller kulstof, og for at opretholde vækst behøver organismen et primærsubstrat som fx metan, toluen, phenol. For at cometabolsk aktivitet skal kunne opretholdes skal primær substratet endvidere være tilstede i en relativ høj koncentration i forhold til de klorerede stoffer, samt at der skal være aerobe forhold. Da disse forhold sjældent er tilstede i forureningskilden eller i størstedelen af en forureningsfane, regnes aerob cometabolisme generelt ikke for at være den primære nedbrydningsvej for klorerede stoffer i forurenede grundvandssystemer. Cometabolsk oxidation er afprøvet som afværgeteknologi i flere tilfælde bl.a. ved tilsætning af metan (Semprini et al., 1990 og 1991; McCarty et al., 1998).

### 2.1.3 Direkte oxidation

Ved direkte oxidation optræder det klorerede stof som elektrondonor mens fx oxygen, sulfat, jern(III) eller andre oxiderede forbindelser optræder som elektronacceptorer.

#### ***Direkte aerob oxidation***

Ved direkte aerob oxidation optræder oxygen som elektronacceptor og mikroorganismen får både energi og kulstof ved nedbrydning af den klorerede forbindelse. Tilstedeværelsen af kloratomer gør et stof mere oxideret sammenlignet med dets ikke-klorerede analog. Dette medfører, at de lavere klorerede stoffer (mest reducerede) har størst tendens til at omsættes ved direkte oxidation.

Under aerobe forhold kan både vinylklorid og *cis*-DCE mineraliseres til kuldioxid gennem direkte oxidation (Davis og Carpenter, 1990; 1998a, 1998b; Bradley og Chapelle, 2000). Vinylklorid nedbrydes hurtigere end *cis*-DCE. Vinylklorid kan under aerobe forhold benyttes som primærsubstrat, hvilket betyder, at mikroorganismer kan anvende vinylklorid som kulstofkilde til vækst og stofskifte (Hartmans et al., 1985; Hartmans og deBont, 1992). Generelt er aerob nedbrydning af vinylklorid og DCE en relativ hurtig proces sammenlignet med reduktiv deklorerings (Wiedemeier et al., 1999).

Af de klorerede ethaner er 1,2-diklorethan nedbrydelig ved direkte oxidation (Stuki et al., 1983; Janssen et al., 1985; McCarty og Semprini, 1994). Stuki et al. (1983) og Janssen et al. (1985) har vist, at 1,2-DCA kan fungere som primærsubstrat under aerobe forhold. I sådanne tilfælde omsættes 1,2-DCA først til klorethanol, som derefter mineraliseres til kuldioxid. Klorethan nedbrydes hurtigt abiotisk ved hydrolyse, og det er derfor usikkert, om direkte oxidation er en betydelig nedbrydningsmekanisme for klorethan (Wiedemeier, 1999).

De højere klorerede stoffer som PCE, TCE, 1,1,1-TCA regnes ikke for at være nedbrydelige via direkte oxidation. Der er til dato ikke fundet mikroorganismer, der kan anvende PCE, TCE, 1,1,1-TCA som primærsubstrat under aerobe forhold. Interessant er det imidlertid, at ifølge teorien er mængden af energi, der er til rådighed for en organisme ved mineralisering af de højere halogenerede forbindelser som tri- og tetraklorethan med ilt som elektronacceptor tilstrækkelig til at understøtte vækst (Dolfing, 2003). Termodynamisk er der altså ingen forklaring på, hvorfor aerob vækst på disse forbindelser ikke er observeret. Når de højere klorerede stoffer ikke omsættes ved direkte oxidation under aerobe forhold skyldes det måske, at de som oftest er mere oxiderede end størstedelen af det tilstedeværende organiske stof i grundvandssystemer. For TCE og 1,1,1-TCA er kun cometabolisk nedbrydning observeret, mens PCE ikke er bionedbrydelig under aerobe forhold.

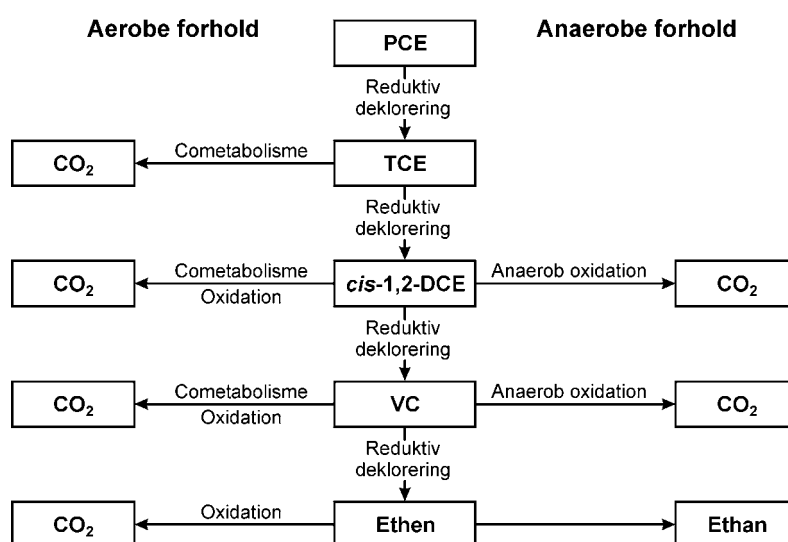
I langt de fleste forureningstilfælde skyldes tilstedeværelsen af VC og DCE reduktiv deklorerings af PCE eller TCE i den anaerobe zone af forureningsfanen. Aerob nedbrydning af klorerede stoffer vil i sådanne tilfælde være begrænset til områder af forureningsfanen, hvor ilten endnu ikke er opbrugt.

### ***Direkte anaerob oxidation***

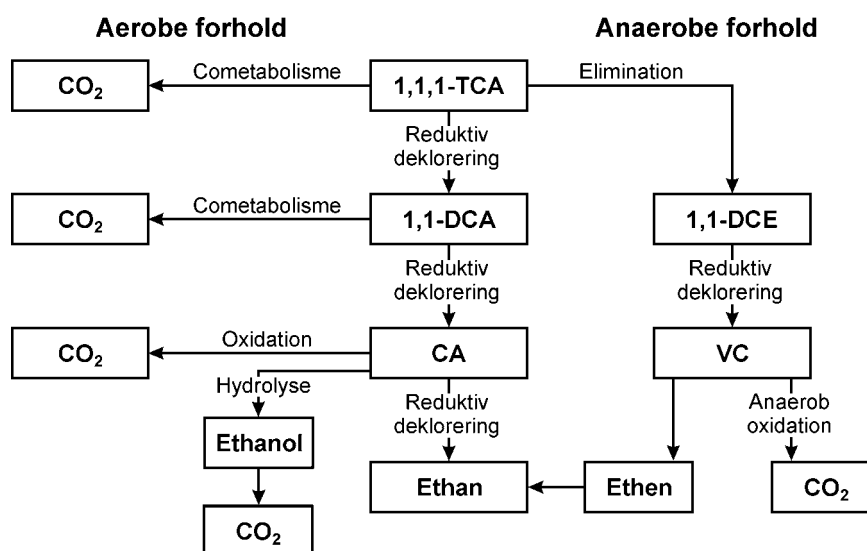
Vinylklorid og i mindre grad også DCE kan mineraliseres til kuldioxid under anaerobe forhold. I en serie forsøg udført af Bradley og Chapelle (1998a) er <sup>14</sup>C-mærket vinylklorid og *cis*-DCE mineraliseret til kuldioxid under forskellige anaerobe forhold inkluderende Fe(III)-reducerende, sulfat-reducerende samt metanogene forhold. Hastigheden og graden af mineralisering aftog med stigende reducerede forhold. Under aerobe forhold var nedbrydningshastigheden for VC og DCE dobbelt så stor som under anaerobe forhold. Mineralisering af DCE til kuldioxid forløber langsommere end VC og kun under mere reducerede forhold. For eksempel omsættes DCE direkte til kuldioxid under Mn(IV)-reducerende forhold, mens mineralisering under jern- og sulfatreducerende forhold sker gennem transformation til VC, som derefter oxideres til kuldioxid (Bradley og Chapelle, 1998a). Yderligere kan organiske forbindelser som humussyrer fungere som elektronacceptor for anaerob oxidation af vinylklorid og DCE (Bradley og Chapelle, 1998).

Bakteriers evne til at oxidere DCE og VC til ikke-toksiske produkter under anaerobe forhold kan være betydningsfulde i tilfælde, hvor naturlig nedbrydning påtænkes at anvendes til oprensning eller afgrænsning af udbredelse af en forurening med klorerede opløsningsmidler. Anaerob deklorerings af PCE/TCE til DCE og VC i kilden og centrale dele af forureningsfanen efterfulgt af anaerob oxidation i yderzonerne af fanen kan være en mulig nedbrydningsvej for fuldstændig nedbrydning af klorerede stoffer.

Figur 2.2 og figur 2.3 viser en oversigt over mulige nedbrydningsveje og nedbrydningsprodukter for PCE og de lavere ethener samt 1,1,1-TCA.



Figur 2.2. Nedbrydning af PCE/TCE ved biologiske processer



Figur 2.3. Nedbrydning af 1,1,1-TCA ved biologiske og abiotiske processer

## 2.2 Redoxprocesser og nedbrydning af klorerede ethener

Bakterier oxiderer organisk stof og mange miljøfremmede organiske stoffer vha. oxidationsmidler, såkaldte terminale elektronacceptorer, hvorved de

opnår energi. De mest almindelige elektronacceptorer er  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  og  $CO_2$  (metanproduktion), der alle er vandopløselige, samt Fe(III) og Mn(IV), som er knyttet til sedimentet (Christensen et al., 2000). Energiudbyttet ved de forskellige redoxprocesser er meget forskelligt (se tabel 2.4). De bakterier, der får størst energiudbytte ved udførsel af oxidationsprocesserne, vil dominere over de andre bakterier, hvilket medfører, at ilt som regel forbruges først, dernæst nitrat osv. Dette betyder, at der udvikles en sekvens af områder, hvor forskellige redox-processer er dominerende. En sådan redox-sekvens udvikles tydeligst i den mættede zone, hvor der er begrænset tilførsel af ilt i modsætning til den umættede zone, hvor der som regel sker en betydelig ilttilførsel fra atmosfæren. Udvikling af redox-sekvenser er observeret nedstrøms forureninger med betydelige indhold af organisk stof fx lossepladser eller oliespild (Miljøstyrelsen, 2000, Christensen et al., 2000). Her ses de mest reducerede forhold (fx metanogene) tættest på kilden, hvor koncentrationen af organisk stof er høj. Oxiderede forhold (aerobt eller nitratreducerende) findes derimod i udkanten af forureningsfanen, hvor koncentrationen og reaktiviteten af organisk stof er lav på grund af den forudgående nedbrydning og fortynding.

Foruden, at organisk stof kan omdannes vha. uorganiske terminale elektronacceptorer, kan en del organisk stof fermenteres (forgæres). Ved fermentering omdannes den organiske forbindelse typisk til en anden, mere reduceret forbindelse ofte samtidig med, at der udskilles  $CO_2$ . Den organiske forbindelse kan alternativt spaltes i to organiske forbindelser, en mere reduceret og en mere oxideret. Resultatet af fermentative processer er ofte korte fede syrer fx acetat og propionat (se afsnit 3.3).

Tabel 2.4. Mikrobielle redox-processer med angivelse af Gibbs fri energi (kcal pr mol) ved pH 7 under standardbetingelser (efter Champ et al., 1979).

		Gibbs fri energi i kcal mol <sup>-1</sup>
Metandannelse, fermentation	$CH_2O \rightarrow \frac{1}{2} CH_3COOH \rightarrow \frac{1}{2} CH_4 + \frac{1}{2} CO_2$ , $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	$\Delta G^\circ(W) = -22$
Sulfat reduction	$CH_2O + \frac{1}{2}SO_4^{2-} + \frac{1}{2}H^+ \rightarrow CO_2 + \frac{1}{2}HS^- + H_2O$	$\Delta G^\circ(W) = -25$
Jern (FeIII) reduktion	$CH_2O + 4Fe(OH)_3 + 8H^+ \rightarrow CO_2 + 4Fe^{2+} + 11H_2O$	$\Delta G^\circ(W) = -28$
Mangan (MnIV) reduktion	$CH_2O + 2MnO_2 + 4H^+ \rightarrow CO_2 + 2Mn^{2+} + 3H_2O$	$\Delta G^\circ(W) = -81$
Nitrat reduktion	$CH_2O + 4/5NO_3^- + 4/5H^+ \rightarrow CO_2 + 2/5N_2 + 7/5H_2O$	$\Delta G^\circ(W) = -114$
Aerob respiration	$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$	$\Delta G^\circ(W) = -120$

Visse miljøfremmede stoffer nedbrydes imidlertid ikke ved oxidation med en elektronacceptor. Klorerede stoffer kan som nævnt i afsnit 2.11 nedbrydes ved halorespiration under anaerobe forhold, hvor den klorerede forbindelse benyttes som elektronacceptor. For at processen kan forløbe kræves, at der er en elektrondonor fx hydrogen eller format tilstede. Ved denne elektrontransport frigives energi, som bakterierne kan udnytte til vækst.

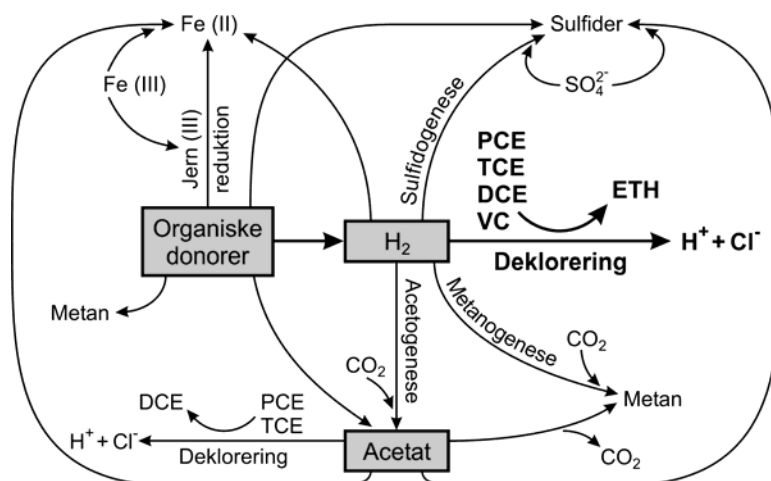
Tilsætning af elektrondonor i form af organisk stof vil imidlertid ikke kun stimulere de deklorerende bakterier, men også aktiviteten af andre bakterier, der kan anvende samme elektrondonor eller produkterne fra nedbrydningen af denne. Dette kan være til gavn for de deklorerende bakterier ved at øge aktiviteten af hydrogenproducerende organismer eller hæmmende ved at øge væksten af metanogene bakterier ved tilsætning af substrater som fx metanol. En simplificeret oversigt af elektrontransporten i komplekse mikrobielle



systemer er vist på figur 2.4, med fokus på de deklorerende bakteriers anvendelse af hydrogen til deklorering af klorerede ethener til ethen. Andre bakterier ser ud til at kunne deklorere PCE/TCE til *cis*-DCE ved anvendelse af acetat som elektrondonor (Krumholz et al., 1996; Krumholz, 1997). Figur 2.4 viser også de elektronacceptorer, der kan være til stede i jord- og grundvandssystemer, undtagen oxygen og nitrat, som er vigtige elektronacceptorer under mere oxiderede forhold.

Samlet set kan tilstedeværelse eller tilsætning af elektrondonor altså have flere effekter:

- understøtte sulfat og jern(III)-reduktion, mangan(IV)-reduktion, nitrat-reduktion, aerob respiration eller ved tilsætning af metanol eller acetat bidrage direkte til metandannelse
- stimulere fermenterende og protonreducerende bakterier til produktion af hydrogen og acetat (se afsnit 3.3)
- kanalisere hydrogen til metandannelse, acetatdannelse, sulfat eller jern(III)reduktion
- tilvejebringe acetat som elektrondonor til sulfat- og jern(III)-reduktion, acetofisk metandannelse samt deklorering af PCE/TCE til *cis*-DCE



Figur 2.4. Anaerob reduktiv deklорering og samspillet med elektrondonorer og konkurrerende elektronacceptorer i komplekse mikrobielle samfund (modificeret efter Fennell og Gossett, 2003).

### 2.3 Mikroorganismer og anaerob deklорering

Dehalospirerende bakterier er i stand til reduktivt at deklорere klorerede organiske stoffer i en anaerob respirationsproces ofte kaldet halorespiration. Klorerede stoffer, der kan anvendes af halorespirerende bakterier, inkluderer bl.a. klorphenoler, klorbenzener, trikloracetat og klorerede ethener. I denne rapport omtales kun halorespirerende bakterier, der kan nedbryde klorerede ethener. Det første bevis på eksistensen af bakterier, der kan koble reduktiv deklорering af PCE til vækst under strikt anaerobe forhold blev præsenteret af Holliger et al. (1993). De observerede, at en oprenset og beriget bakteriekultur voksede ved reduktion af PCE til *cis*-DCE med hydrogen som elektrondonor. Denne bakterie, der kun kan anvende hydrogen som elektrondonor og yderligere kun kan koble vækst til reduktion af PCE eller TCE til *cis*-DCE fik siden navnet *Dehalobacter restrictus*.

Siden 1993 er flere renkulturer blevet isoleret, som kan anvende klorerede ethener til vækst ved halorespiration. Halorespirerende bakterier er fundet i flere forskellige fylogenetiske grupper, hvoraf mange er genetisk relateret til gram-positive og gram-negative sulfat-reducerende bakterier. I tabel 2.5 er vist de halorespirerende bakterier, der kan deklorere PCE samt deres karakteristika.

Mange af de deklorerende bakterier er i stand til at anvende flere forskellige elektrondonorer til reduktion af PCE eller TCE. Ofte anvendte elektrondonorer inkluderer pyruvat, laktat, format og hydrogen. *Dehalobacter restrictus* og *Dehalococcoides ethenogens* er begrænset til anvendelsen af hydrogen, mens *Desulfuromonas chlorethanica* kan anvende acetat, men ikke hydrogen. Andre organiske stoffer, der kan anvendes som elektrondonorer af de halorespirerende bakterier, inkluderer fermenteringsprodukterne ethanol, propionat og butyrat. Hydrogen og format er vigtige elektrondonorer for størstedelen af de halorespirerende bakterier og spiller en vigtig rolle i syntrofiske interaktioner mellem bakterier, der oxiderer fermenteringsprodukter som propionat, butyrat og ethanol og andre bakterier, der anvender disse substrater (se afsnit 3.3).

Blandt de PCE-deklorerende halorespirerende bakterier er det kun *Dehalococcoides ethenogens 195*, der reductivt kan deklorere PCE eller TCE fuldstændigt til ethen. Det sidste trin i dekloreringsfølgen fra vinylklorid til ethen foregår formentlig ved cometabolsk transformation og er ikke kædet sammen med anaerob respiration (Maymó-Gatell et al. 1997). Andre PCE-deklorerende halorespirerende bakterier som *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S og TCE1, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfomonas chloroethanica* TT4B og *Dehalospirillum multivorans* kan kun deklorere PCE til *cis*-DCE. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1 deklorerer kun PCE til TCE. Denne bakteriestamme kan dog også anvende klorphenol-lignende forbindelser som elektronacceptor - en egenskab man også finder hos den PCE-deklørende *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S.

Tabel 2.5. Halorespirerende bakterier der kan deklorere PCE.

Organisme	Elektron donor	Elektronacceptorer	Deklorering	Kulstofkilde	Kilde
<i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	H <sub>2</sub>	PCE, TCE	PCE→ <i>cis</i> -DCE	Acetat, CO <sub>2</sub>	a,b
<i>Dehalobacter restrictus</i> TEA and PER-K23	H <sub>2</sub>	PCE, TCE	PCE→ <i>cis</i> -DCE	Acetat, CO <sub>2</sub>	b,c
<i>Dehalospirillum multivators</i>	H <sub>2</sub> , pyruvat, laktat, ethanol, format, glycerol	PCE, TCE, fumarat, nitrat	PCE→ <i>cis</i> -DCE	Acetat	d,e,f
<i>Desulfitobacterium</i> PCE1	Laktat, pyruvat, butyrat, format, succinat, ethanol	PCE, sulfit, thiosulfat, fumarat, (fors. klorphenoler)	PCE→TCE	Laktat, pyruvat,	g
<i>Desulfitobacterium</i> TCE1	H <sub>2</sub> , laktat, butyrat, malat, format, serin, ethanol	PCE, TCE, sulfit, nitrat, fumarat	PCE→ <i>cis</i> -DCE		h,i
<i>Desulfitobacterium</i> PCE-S	Pyruvat, format, gær ekstrakt (H <sub>2</sub> , format)*	PCE, TCE, fumarat, sulfit	PCE→ <i>cis</i> -DCE	Acetat	j
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> JW/IU-DC1	H <sub>2</sub> , format, laktat, pyruvat,	PCE, sulfit, sulfat, thiosulfat, nitrat, fumarat, (fors. klorphenoler)	PCE→TCE	Pyruvat, laktat	k
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	Acetat, pyruvat	PCE, TCE, fumarat, Fe(III), nitriloacetat, polysulfid	PCE→ <i>cis</i> -DCE	Acetat	l,m
<i>Dehalococcoides ethenogens</i> Strain 195	H <sub>2</sub>	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE, 1,2-DCA, 1,2-DBA, ( <i>trans</i> -DCE, VC) <sup>a</sup>	PCE→VC/Ethene	Acetat	n

\* Dehalogenering uden kobling til vækst

Referencer. a: Holliger et al., 1993; b: Holliger et al., 1998; c: Wild et al., 1996; d: Scholz-Muramatsu et al., 1995; e: Neumann et al., 1995; f: Neumann et al., 1994; g: Gerritse et al., 1996b; h: Gerritse et al., 1996a; i: Gerritse et al., 1997; j: Miller et al., 1996; k: Utkin et al., 1995; l: Krumholz, 1996; m: Krumholz 1997; n: Mayó-Gatell et al., 1997.

De fleste halorespirerende bakterier er istand til at bruge andre elektronacceptorer end klorerede stoffer. To undtagelser er dog ***Dehalobacter restrictus*** og ***Dehalococcoides ethenogens***, hvilket er overraskende, da klorerede ethener sandsynligvis ikke akkumuleres i signifikante mængder til at garantere overlevelse under naturlige forhold. Flere halorespirerende bakterier kan anvende nitrat som elektronacceptor. Sulfu-oxyanioner som sulfit, thiosulfat, og i enkelte tilfælde sulfat anvendes af flere af de halorespirerende bakterier som elektronacceptorer. Inhibering af deklorering er observeret ved tilstedeværelse af konkurrerende elektronacceptorer som nitrat, sulfit, thiosulfat og format (Holliger et al., 2003). Reguleringsmekanismen for hvilken elektronacceptor, der induceres, er endnu ukendt. Forsøg har dog vist, at deklorering kun induceres ved tilstedeværelse af klorerede elektronacceptorer.

Ved anvendelse af stimuleret reduktiv deklorering som afværgeteknologi er det afgørende, at der opnås fuldstændig nedbrydning af PCE eller TCE til ethen. På lokaliteter, hvor der ses akkumulering af *cis*-DCE, kan det skyldes, at halorespirerende bakterier af typen ***Dehalococcoides*** ikke er tilstede, og det kan

derfor være en mulighed at pøde med disse bakterier (bioaugmentation). For optimal vækst af *Dehalococcoides* kræves tilstedeværelse af andre bakterier, der dels kan fermentere elektrondonorer til hydrogen og dels producere ko-faktorer, der er nødvendige for *Dehalococcoides*. Mikrobielle kulturer, der er udviklet til *in situ* oprensning, består derfor typisk ikke af en enkelt type af *Dehalococcoides*, men indeholder en blanding af forskellige mikroorganismer. Der eksisterer flere blandingskulturer, der er opformeret til at kunne nedbryde PCE eller TCE fuldstændigt til ethen. Flere af disse har været anvendt *in situ* til oprensning af grunde forurenet med PCE eller TCE. I tabel 2.6 er anført blandede bakteriekulturer, der kan nedbryde PCE til ethen. Endvidere er vist, hvorvidt disse kulturer har været anvendt i afværgeprojekter, og om de er kommercielt tilgængelige (se også afsnit 4.5.1).

Tabel 2.6. Blandede bakteriekulturer der kan deklorere PCE eller TCE fuldstændigt til ethen.

Navn på blandede bakteriekultur	Kilde	Reference	Kommercielt tilgængelige	Testet i feltet	Testet for patogener
"Cornell" Enrichment	Ithaca spildevandsrensingsanlæg, NY	Maymo-Gatell et al. 1997; Maymo-Gatell et al. 2001	Nej	Nej	Nej
"Pinellas" Enrichment	Forurenet jord, Florida	Ellis et al. 2000; Harkness et al. 1999	?	Ja	Begrænset coliforme bakterier
"Victoria" Enrichment	Forurenet jord, Victoria, Texas	Cupples et al. 2003	Nej	Nej	Nej
<i>KB-1</i> Dechlorinator	Forurenet jord, Ontario	Duhamel et al. 2002; Major et al. 2002	Ja	Ja	Ja
"Toronto Main" Enrichment	Toronto Main spildevandsrensingsanlæg	Dennis et al. 2003	Nej	Nej	Nej
ANAS Enrichment	Alameda Naval Flyvestation	Richardson et al. 2002	Nej	Nej	Nej
LEC1 Enrichment	Slam fra anaerob nedbrydningsstank	Adamson and Parkin. 2000	Nej	Nej	Nej
"Cape Canaveral" Enrichment	Cape Canaveral Flyvestation, Florida.	Fennell et al. 2001	Nej	Nej	Nej
"Bachman Road" Enrichment	Bachman Road lokalitet, akvifer i Oscoda, Michigan	Loeffler et al. 2000; He et al. 2003; Lendvay et al. 2003	Ja	Ja	Nej

#### 2.4 Mikrobielle metoder til undersøgelse af *Dehalococcoides*

Undersøgelse for tilstedeværelse af *Dehalococcoides* spp. i sediment og grundvandsprøver kræver særlige mikrobielle teknikker. På grund af *Dehalococcoides* spp. samspil med andre mikroorganismer samt behovet for unikke vækstfaktorer kan konventionelle metoder som pladespredning ikke anvendes. I stedet må der anvendes DNA-baserede metoder. Polymerase kæde-reaktion (PCR: polymerase chain reaction) anvendes for at lave en forstærkning af signalet i begge de hidtil anvendte teknikker. I den ene teknik analyseres PCR-produktet ved en ordinær gelelektroforese (PCR-GE), mens produktet i den anden teknik analyseres ved denaturerende gradient gelelektroforese (denaturing gradient gel-electrophoresis: DGGE) efterfulgt af sekventering. Begge teknikker baserer sig på 16S rDNA-genet, da dette indeholder meget varierede og konserverede sekvenser, som kan bruges til at

identificere grupper, arter og stammer af bakterier. Sådanne DNA-fingerprint-metoder eller molekylæranalyser kan anvendes til at spore vækst og transport af bakterier tilsat jord- og grundvandssystemer i forbindelse med biostimulering (Hendrickson et al. 2001; Hristova et al. 2001; Dybas et al. 2002; Major et al. 2002; Lendvay et al. 2003), eller til at undersøge for tilstedeværelsen af specifikke bakterier fx *Dehalococcoides* med henblik på at vurdere behovet for at pøde med bakterier for at opnå fuldstændig nedbrydning af PCE/TCE til ethen.

PCR retter sig mod specifikke variable regioner i 16S rDNA ved anvendelse af korte stykker DNA (kaldet oligonukleotider eller PCR primere), som er kemisk syntetiseret og har en kendt sekvens, der binder til den korresponderende komplementære sekvens i 16S rDNA genet. Ved PCR-processen replikeres et specifikt stykke med en tilhørende bestemt størrelse af dette gen. Produkterne dannet ved PCR-processen overføres til en gel som påsættes en elektrisk strøm (gel elektro-phorese). PCR-produkterne har en kendt størrelse og vil vandre et bestemt stykke afhængig af dets molekylære størrelse (som verificeres af en intern række af genfragmenter af kendt størrelse). Såfremt PCR produktet er tilstede, vil det forme et synligt bånd, når det udsættes for ultraviolet lys. Bånd svarende til en bestemt molekylstørrelse indikerer tilstedeværelse af *Dehalococcoides*, hvorimod fravær af bånd indikerer, at der ikke er *Dehalococcoides* i den specifikke prøve.

I modsætning til PCR efterfulgt af ordinær gelelektroforese anvender man ved DGGE universale primere, som ligeledes vil hæfte sig til 16S rDNA og medføre, at det replikeres. I stedet for at replikere genet for blot een enkelt mikroorganisme replikeres genet for alle mikroorganismer i prøven. Sekvensen af basepar er unik for hver mikroorganisme, hvorfor disse vil denatureres med forskellig hastighed under vandring igennem en gel under eksponering for en stigende koncentration af urinstof. Når PCR produktet er fuldstændig denatureret, vil det stoppe videre vandring i gelen. Resultatet er at der dannes forskellige bånd (i modsætning til PCR-GE hvor der dannes eet bånd), hvor hvert bånd repræsenterer en bakteriestamme eller art. Båndene kan herefter klippes ud af gelen, og det amplificerede 16S rDNA sekventeres for at bestemme rækken af basepar i nukleotiderne. Identifikation sker ved at sammenligne de fundne nukleotid-sekvenser med nukleotid-sekvenser for kendte mikroorganismer via en international database.

PCR efterfulgt af ordinær gelelektroforese (PCE-GE) er den mest anvendte af disse metoder, da den er relativt let at anvende og kan justeres til at identificere en bestemt bakterieart eller stamme. Selvom PCR-GE generelt ikke er en kvantitativ metode, er der en korrelation mellem intensiteten af gelbåndet, og mængden af genmateriale ekstraheret fra den oprindelige prøve. Der eksisterer kvantitative PCR-metoder, som kan anvendes til at bestemme antallet af specifikke gener i den oprindelige prøve. Der eksisterer flere teknikker til kvantificering eller semi kvantificering af PCR produkter (Fredslund et al., 2001; Johnsen et al., 1999), men en ny teknik, der er baseret på online målinger af PCR produktet, er REAL-TIME PCR. Der er endnu ikke publiceret nogle kvantitative teknikker for *Dehalococcoides* detektion, men metoderne er i en rivende udvikling.

# 3 Stimuleret reduktiv deklorering: Laboratorieforsøg

På basis af den tilgængelige videnskabelige litteratur præsenterer dette kapitel en oversigt over den viden om anaerob reduktiv deklorering, der er tilvejebragt via laboratorieforsøg.

Litteraturindsamlingen, der danner basis for følgende afsnit, fremgår af appendiks A.1 Der er i alt udvalgt ca. 43 artikler, der beskriver forskellige laboratorieforsøg vedrørende anaerob reduktiv deklorering. De artikler, der er vurderet som de mest betydningsfulde, er markeret med gult.

## 3.1 Oversigt over laboratorieforsøg

Der er udført en lang række laboratorieforsøg for at undersøge potentialet for at stimulere anaerob deklorering ved at tilsætte forskellige substrater. Ofte har formålet været at sammenligne effektiviteten af forskellige substrater samt at belyse hvilke faktorer, der styrer forskellige substraters egnethed. Laboratorieforsøg kan endvidere belyse, om et substrat udover at fungere som elektrondonor har en toksisk virkning overfor de deklorerende bakterier eller andre bakterier, der deltager i nedbrydningsprocessen. Substrater, der har været testet i laboratorieforsøg, inkluderer let omsættelige organiske stoffer som fx laktat, ethanol og propionat men også mere komplekse organiske stoffer som spiseolie, melasse og kompostekstrakt. Substraterne tilsættes i forsøgene i højere koncentration end det støkiometriske forhold, der er krævet til dekloreringsprocessen. Typiske substratkoncentrationer er i størrelsesordenen 2-5mM (se også afsnit 3.7.2). Tabel 3.1 viser et udsnit af laboratorieforsøg vedrørende reduktiv deklorering beskrevet i den videnskabelige litteratur.

Laboratorieforsøgene er ofte udført som batchforsøg, dvs. flaskeforsøg i lukkede, opblandede systemer. Der udtages enten løbende prøver fra en flaske, eller der kan opstilles flere ens flasker, hvor hver flaske svarer til en prøve (høstforsøg) (se afsnit 3.7.2). Enkelte laboratorieforsøg er udført som søjleforsøg, hvilket giver mulighed for at studere nedbrydningsprocesserne i et flow-system. Disse systemer er mere naturtro, men også sværere at kontrollere. Langt de fleste laboratorieforsøg er udført med klorerede ethener, og der er kun lavet enkelte forsøg med 1,1,1-TCA.

Mange af laboratorieforsøgene er udført med en bakteriekultur, der er blevet opformeret (dyrket) på PCE eller TCE. Ofte er slam fra anaerobe nedbrydnings-reaktorer på spildevandsrensingsanlæg anvendt som inokulum, eller der er anvendt sediment og grundvand fra PCE eller TCE-forurenedede lokaliteter. I mange af disse studier ses fuldstændig deklorering af PCE eller TCE til ethen. I studier, hvor der kun ses nedbrydning til *cis*-DCE, er det i nogle tilfælde forsøgt at tilsætte opformede bakteriekulturer med bakterier af typen *Dehalococcoides*, hvorefter der opnås nedbrydning til ethen. Nogle forsøg er udført med grundvand tilsat næringsmedie, mens andre forsøg er udført med en blanding af sediment og grundvand. Endvidere er der udført en række dyrkningsforsøg med renkulturer med henblik på at kortlægge

egenskaber hos specifikke haloinspirerende bakterier. I dette afsnit er sådanne studier tillagt mindre vægt, da disse studier ikke er udført med henblik på anvendelse i afværgeteknikker, men mere for at tilvejebringe specifik viden om haloinspirerende bakterier. Yderligere er der udført laboratorieforsøg for at undersøge om andre forureningskomponenter som fx klorerede metaner kan have en toksisk virkning på nedbrydningen af klorerede ethener. Langt de fleste laboratorieforsøg er udført med bakteriekulturer i det mesofile temperaturområde (20-37°C), som er klart over danske grundvandstemperaturer (10°C, se afsnit 3.6.1).

Tabel 3.1. Deklorering af klorerede ethener observeret i laboratorieforsøg tilsat forskellig elektrondonorer.

Inokulum	System	Deklorering	Elektrondonor	Kommentarer	Ref.
Sediment fra en TCE-forurenede lokalitet Pinellas kultur: dyrket på acetat, laktat, gær ekstrakt	B – sediment og grundvand Tilsat Pinellas kultur til nogle batch	TCE → <i>cis</i> -DCE TCE → ethen	Butyrat, benzoat, acetat, ethanol, molasses, laktat 200 mgC/L	Tilsætning af forskellige donorer medførte ikke nedb. af <i>cis</i> -DCE kun ved tilsætning af Pinellas kultur	a
Sediment fra en TCE-forurenede lokalitet	B/R – sediment og næringsmedie	TCE → VC/ethen	Metanol og laktat 100-5000 mgCOD/L	Højere rater blev observeret når metanol blev blandet med laktat. Sulfat havde ingen effect på fjernelse af TCE	b
Sediment og grundvand fra en lokalitet forurenede med klorethener	B – sediment og grundvand	PCE → ethen	H <sub>2</sub> (350.000 ppmv) format, acetat, pyruvat, laktat, fumarat, glycerol, glukose (2,5 mM) melasse, valle (1 mg/L)	Nedb. af PCE til ethen forløb uafhængig af tilsætning af donor. Højere rater sås ved tilsætning af acetat sammenlignet med, når kun H <sub>2</sub> blev tilsat	c
Sediment og grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet	B – sediment og grundvand	TCE → VC/ethen	Laktat, butyrat, benzoat, propionat, (3 mM) Tilsat gærekstrakt og/eller vitamin B <sub>12</sub>	Alle donorer virkede og <i>Dehalococcoides</i> blev identificeret	d
Flodsediment beriget ved PCE-tilsætning: ikke-metanogen kultur	B -	PCE → ethen TCE → ethen <i>cis</i> -DCE → ethen VC → ethen	Acetat (5 mM) H <sub>2</sub>	Kulturer dyrket på <i>cis</i> -DCE og VC mistede deres evne til at nedbryde PCE	e
Jord fra en forurenede lokalitet. Dyrket på laktat	B – (ANAS Kultur)	TCE → ethen	Laktat 10-20 mM	Domineret af populationer tilhørende <i>Desulfovibrio</i> , <i>Dehalococcoides</i> , <i>Clostridiaceae</i>	f
Anaerob reaktor oprindelig tilsat sediment fra en PCE-forurenede lokalitet. Dyrket på benzoat, gær ekstrakt og PCE	B – intet sediment	PCE → ethen <i>cis</i> -DCE → ethen	benzoat, propionat 300-650 µmol/L	Højere rater sås ved tilsætning af propionat	g
Anaerob reaktor indeholdende metandannende granula slam inokuleret med sediment fra en forurenede lokalitet. Dyrket på metanol, glukose og PCE	B – granula, basal medium	PCE → ethen	Sukker melasse Træflis af hårdt træ, majscolber, avispapir	TCE blev nedbrydt til ethen uafhængig af donortype	h
Sediment og grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet. Dyrket på TCE og metanol	B – næringsmedie	PCE → ethen TCE → ethen <i>cis</i> -DCE → ethen VC → ethen	Metanol, ethanol, hydrogen, laktat og propionat 1-3 mM	TCE blev nedbrudt til ethen uafhængig af donortype. Kulturer dyrket på VC mistede deres evne til at nedbryde PCE	i
Grundvand. Til nogle forsøg blev tilsat en kultur dyrket på buthanol	B – grundvand	TCE → ethen	Tetrabutoxysilane: langsomt frigivende substrat		j
Grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet. Dyrket på glukose	B - grundvand	TCE → ethen	Glukose, acetat, format, metanol 1 mM	Kun fuldstændig nedbrydn. ved tilsætn. af glukose	k
Grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet. Dyrket på glukose	B - grundvand	PCE → ethen	Glukose 30 mM		l

B: laboratorie batchforsøg K: kolonne forsøg R: anaerob reaktor

Referencer: a: Ellis et al., 2000; b: El Mamouni et al., 2002; c: He et al., 2002; d: Fennel et al., 2001; e: Flynn et al., 2000; f: Richardson et al., 2002; g: Yang & McCarty, 1998; h: Wu et al., 1998; i: Duhamel et al., 2002; j: Yu & Semprini, 2002; k: Bolesch et al., 1997; l: Nielsen & Keasling, 1999.



### 3.2 Substrater - elektrondonorer

I PCETCE-forurene jord- og grundvandssystemer kan nedbrydning via reduktiv deklorering ofte stimuleres ved tilsætning af elektrondonorer. Stimuleringen kan også ske "naturligt" på lokaliteter, hvor der udover klorerede opløsningsmidler er spildt andre forureningskomponenter, som fx lossepladsperkolat eller olieforbindelser, der kan fungere som elektrondonor for de halo-respirerende bakterier (se fx Miljøstyrelsen, 2000; Christensen et al., 2001).

De fleste anaerobe halo-respirerende bakterier kan anvende hydrogen som elektrondonor. *Dehalococcoides ethenogens*, der som de eneste kan deklorere PCE/TCE til ethen, anvender udelukkende hydrogen som elektrondonor. Stimulering af anaerob deklorering er derfor ofte forsøgt ved enten at tilsætte hydrogen direkte eller ved at tilsætte substrater, der via fermentering danner hydrogen (se afsnit 3.3). De mest brugte substrater er laktat, metanol, ethanol, butyrat, benzoat, propionat, og acetat. I tabel 3.2 er reaktionsligningerne for omdannelse af de enkelte substrater vist samt energigevinsten ved de forskellige reaktioner under standardbetingelser. Der er dog også udført forsøgt med organiske stoffer med kompleks sammensætning som valle, melsse, spiseolier, avisulp og træflis. Tabel 3.1 viser laboratorieforsøg med stimuleret deklorering af klorerede ethener ved tilsætning af forskellige elektrondonorer.

Tilsætning af substrater som laktat og ethanol vil omsættes hurtigt, pga. det relativt høje energiudbytte sammenlignet med andre substrater (se tabel 3.2). Den hurtige fermentering vil medføre dannelse af høje koncentrationer af hydrogen, som kan udnyttes af de deklorerende bakterier. I laboratorieforsøg tilsat TCE sås en mere optimal deklorering ved tilsætning af en blanding af laktat og metanol, end når der tilsattes metanol alene (El Mamouni et al., 2002).

For optimal stimulering af anaerob deklorering er den generelle hypotese, at dette opnås bedst ved tilsætning af et substrat, der fermenteres langsomt under dannelse af lave hydrogen niveauer. Under sådanne forhold med en stabil tilførsel af hydrogen vil de deklorerende bakterier være konkurrencedygtige over andre hydrogenforbrugende organismer fx metanogene bakterier (se afsnit 3.4).

I laboratorieforsøg udført af Fennel et al. (1997) sås det, at tilsætning af smørsyre (syreformen af butyrat) og propionsyre resulterede i mindre metandannelse end ved tilsætning af ethanol og mælkesyre (syreformen af laktat), som genererede høje H<sub>2</sub>-nivauer. I korttidsforsøg (48 timer) tilsat ethanol og mælkesyre sås en hurtig og høj produktion af hydrogen, der medførte en hurtig initial nedbrydning af PCE. Forbruget af hydrogen førte dog til nedsat deklorering, hvilket resulterede i ufuldstændig og langsom omdannelse af PCE. I langtidsforsøg (128 dage) var dekloreringshastigheden dog uafhængig af, om der var tilsat ethanol, mælkesyre, smørsyrer eller propionat, hvilket formentlig skyldtes, at en del af den tilsatte mælkesyre og ethanol omsattes til propionsyre, der langsomt fermenteredes under frigivelse af hydrogen.

Yang og McCarty (1998) har sammenlignet nedbrydningen af *cis*-DCE ved tilsætning af hhv. propionat og benzoat. I forsøg tilsat propionat sås en tre gange højere produktion af ethen ved deklorering af *cis*-DCE sammenlignet

med forsøg tilsat benzoat, hvor der til gengæld sås en tre gange højere produktion af metan.

Ved stimulering af reaktiv deklorering ved tilsætning af substrat vil der være et tab pga. konkurrencen om hydrogen til andre ikke deklorerende bakterier. Sewell et al. (1991) har undersøgt nedbrydningen af PCE i mikrokosmosforsøg med en blandingskultur tilsat toluen som substrat. De fandt, at under 10% af reduktionspotentialet dannet ved fermentering af toluen blev brugt til deklorering. Ballapragada et al. (1997) fandt tilsvarende resultater i PCE-nedbrydningsforsøg udført i en fluidized-bed-reaktor tilsat en blandingskultur. Reaktoren blev tilsat forskellige fermentering baserede elektrondonorer og man fandt at 95% af den producerede hydrogen blev brugt til andre porcesser end deklorering.

Tabel 3.2. Reaktionsligninger for omsætning af substrater til H<sub>2</sub> med angivelse af Gibbs fri energi (kJ pr reaktion) ved standardbetingelser (efter He et al, 2002; og Dol fing, 1988).

Substrat	Reaktionsligning	ΔG° (kJ/reaktion)
Laktat	$\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	-3,96
Ethanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	9,65
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	23,03
Butyrat	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	48,30
Benzoat	$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + 3\text{H}^+$	53
Propionat	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	76,48
Acetat	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	104,55

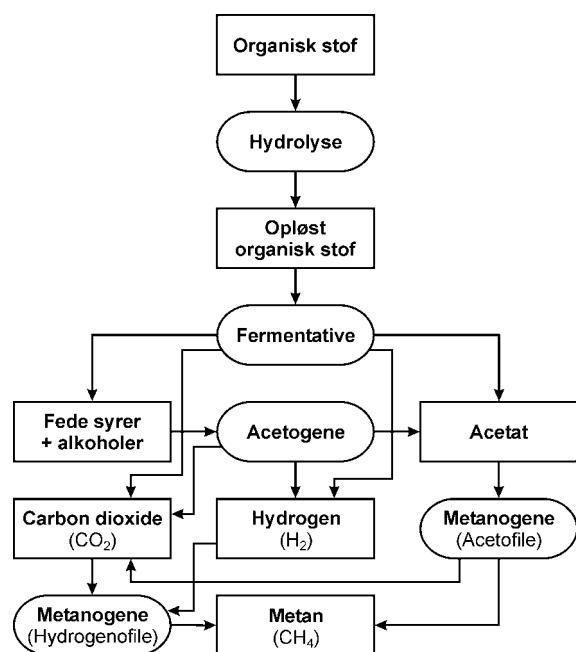
### 3.3 Fermentering

Fermentering er en redoxproces, hvor det enkelte substrat fungerer både som elektrondonor og elektronacceptor. Ved fermentering produceres generelt mindre energi per enhed substrat end ved oxidationsprocesser, hvor der indgår en ekstern elektronacceptor som fx ilt, nitrat eller klorerede stoffer.

Bakteriel fermentering kan opdeles i to faser: primær og sekundær fermentering. Forløbet for fermentering af organisk stof er illustreret i figur 3.1. Ved primær fermentering vil fermenterende bakterier og svampe først nedbryde komplekst organisk materiale ved hydrolyse til primærsubstrater som sukkerstoffer, aminosyrer, og lipider, der herefter fermenteres til flygtige syrer (laktat, succinat, propionat, butyrat), alkoholer (ethanol, metanol), acetat, hydrogen, og kuldioxid. De fermentative bakterier er en stor heterogen gruppe af anaerobe og fakultative anaerobe bakterier. Tabel 3.3 viser nogle af de betydende reaktioner. Ved sekundær fermentering omdannes produkterne dannet under den primære fermentering af acetogene bakterier til acetat, hydrogen og kuldioxid (se tabel 3.3). De acetogene bakterier hører til gruppen af obligate protonreducerende bakterier, da der ved den sekundære fermentering dannes hydrogen for at balancere oxidationen af kulstofsubstrater.

Ved fraværet af andre elektronacceptorer vil der dannes metan, som det sidste led i den anaerobe metabolisme (her optræder kulstof i sin mest reducerede

form – oxidationstrin -4). De metanogene bakterier er obligat anaerobe og kræver lave redoxpotentialer. Metandannelse udføres af acetofile bakterier, der omdanner acetat til metan og kuldioxid eller af hydrogenofile bakterier, der omsætter hydrogen og kuldioxid til metan. Andre metanogene bakterier kan omdanne myresyre og metanol til metan. Den sekundære fermentering er kun energimæssig favorabel ved hydrogen koncentrationer under et niveau omkring  $10^{-2}$  til  $10^{-4}$  atm eller 8000 til 80nM opløst hydrogen (afhængig af hvilket substrat som fermenteres) (Wiedemeier et al., 1999). Dette betyder, at hvis den dannede hydrogen ikke forbruges af andre bakterier som fx de metanogene bakterier (hydrogenofile bakterier til metandannelse), vil de fede syrer dannet under den primære fermentering akkumuleres, hvilket kan medføre en forsurening af miljøet, og inhibering af de metandannende bakterier (Christensen et al., 1996). Dette samspil mellem de fermenterende bakterier og de hydrogenotrofe bakterier kaldes syntrofi, da begge typer af bakterier får udbytte af hinandens tilstedeværelse – de hydrogenforbrugende bakterier får leveret elektron donor i form af hydrogen, mens omsætning af denne medfører at de fermentative bakterier kan nedbryde yderligere organisk materiale til vækst.



Figur 3.1. Mikrobiel nedbrydning af organisk materiale under anaerobe forhold (efter Christensen et al., 1996).

Tabel 3.3. Anaerobe processer der omsætter organisk stof.

Fermentative processer		
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O$	→	$2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$
$C_6H_{12}O_6$	→	$CH_3C_2H_4COOH + 2H_2 + 2CO_2$
$C_6H_{12}O_6$	→	$2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
Acetogene processer		
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	→	$CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$
$CH_3C_2H_4COOH + 2H_2O$	→	$2CH_3COOH + 2H_2$
$CH_3CH_2OH + H_2O$	→	$CH_3COOH + 2H_2$
$C_6H_5COOH + 6H_2O$	→	$3CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$
Metanogene processer		
$4H_2 + CO_2$	→	$CH_4 + 2H_2O$ (hydrogenofile bakterier)
$CH_3COOH$	→	$CH_4 + CO_2$ (acetofile bakterier)
$HCOOH + 3H_2$	→	$CH_4 + 2H_2O$
$CH_3OH$	→	$CH_4 + H_2O$

HCOOH: myresyre (format: HCOO<sup>-</sup>)

CH<sub>3</sub>OH: metanol

CH<sub>3</sub>COOH: eddikesyre (acetat: CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH: ethanol

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH: propionsyre (propionat: CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>)

CH<sub>3</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COOH: smørsyre (butyrat: CH<sub>3</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>COO<sup>-</sup>)

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH: benzoesyre (benzoat: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COO<sup>-</sup>)

### 3.4 Mikrobiel konkurrence om hydrogen

Mange forskellige bakterier kan bruge hydrogen som elektrondonor: denitrificerende bakterier, jern (III)- og sulfatreducerende bakterier, metanogene samt haloinspirerende bakterier (se tabel 3.4). Produktion af hydrogen ved fermentering er derfor ikke en garanti for, at hydrogen er til rådighed for de haloinspirerende bakterier. For at deklorering kan forløbe, må de deklorerende bakterier konkurrere succesfuldt om den tilgængelige hydrogen med andre mikroorganismer. I litteraturen er anført typiske niveauer for hydrogenkoncentrationer, hvor forskellige redoxprocesser typisk er dominerende (tabel 3.5, se også diskussion i afsnit 4.2.2).

Tabel 3.4. Reaktionen hvor H<sub>2</sub> bruges som elektrondonor med angivelse af Gibbs fri energi (kcal/mol e<sup>-</sup>) under standforhold (Wiedemeier et al., 1999).

Elektronacceptor	Reaktion	ΔG° <sub>r</sub> (kcal/mol e <sup>-</sup> )
Oxygen	$\frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	-28,5
Nitrat	$\frac{2}{5}\text{NO}_3^- + \frac{2}{5}\text{H}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \frac{1}{2}\text{N}_2 + \frac{6}{5}\text{H}_2\text{O}$	-27,0
Jern(III)	$2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2 \rightarrow 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+$	-19,6
Sulfat	$\frac{1}{4}\text{SO}_4^{2-} + \frac{3}{8}\text{H}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \frac{1}{8}\text{H}_2\text{S} + \frac{1}{8}\text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$	-4,8
Kuldioxid	$\frac{1}{4}\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \frac{1}{4}\text{CH}_4 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	-4,1
PCE	$\text{C}_2\text{Cl}_4 + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{HCl}_3 + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-19,7
TCE	$\text{C}_2\text{HCl}_3 + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2 + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-19,4
DCE	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_3\text{Cl} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-17,1
VC	$\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl} + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4 + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-18,7

I laboratorieforsøg tilsat PCE resulterede tilsætning af ekstra metanol for at stimulere anaerob deklorerende i vækst af metandannende bakterier frem for deklorerende bakterier (Stover, 1993). Tilsætning af yderligere metanol, ud fra tanken om at kompensere for det øgede forbrug, resulterede i, at dekloreringsprocessen gik helt i stå, fordi de deklorerende bakterier blev udkonkurreret af de metandannende bakterier. Tilsætning af ikke-metandannende substrater som organiske syrer, der kan fermenteres direkte til hydrogen, kan være en måde at undertrykke den direkte konkurrence med metanogene bakterier (Fennell og Gossett, 2003).

Hydrogenotrofe deklorerende bakterier har en lavere tærskelværdi for hydrogen (omkring 1nM) end metanogene bakterier (5nM, tabel 3.5), og kan derfor udkonkurrere hydrogenotrofe metanogene bakterier ved lave hydrogenkoncentrationer (Smatlak et al., 1996). Tilsætning af elektrondonor i form af fede syrer (acetat, propionat, butyrat), som kun muliggør produktion af hydrogen i lave koncentrationer (jvf. tabel 3.2) kan bruges til at kanalisere hydrogen til deklorerende frem for metandannelse (Yang og McCarty, 1998; Fennell, et al, 1997).

Konkurrence fra sulfat-reducerende bakterier er et mere komplekst problem. Sulfat-reducerende bakterier består af en divers gruppe af organismer, som kan udnytte mange forskellige organiske forbindelser udover hydrogen. Hydrogen-niveauer på mellem 1-15 nM er fundet i forbindelse med sulfatreduktion i flere laboratoriekulturer og sediment (Lovley og Klug, 1983; Mazur og Jones, 2001; Robinson og Tiedje, 1984). Hydrogenniveauet for deklorerende bakterier er lidt lavere men ikke væsentligt lavere end for de sulfat-reducerende bakterier (Ballapragada et al., 1997; Löffler et al., 1999, Smatlak et al., 1996). Fravær af deklorerende er observeret i flere tilfælde under sulfat-reducerende forhold. Dette kan skyldes flere forhold: 1) direkte konkurrence om tilsatte organiske elektrondonorer, 2) inhibering af enzymer involveret i deklorerende ved tilstedeværelse af sulfat, thiosulfat, sulfit eller sulfidioner, 3) selektiv brug af sulfat, thiosulfat eller sulfit som terminal elektronacceptor i respirationsprocessen i stedet for klorerede stoffer (se afsnit 2.3).

I miljøer med højt sulfatindhold kan populationen af deklorerende bakterier være lav i forhold til populationen af sulfatreducerende bakterier. Ved tilsætning af elektrondonor kan H<sub>2</sub> produktionen være så høj, at de

deklorerende bakterier ikke kan bringe den så langt ned, at energigevinsten for sulfatreduktion falder under tærskelværdien. På trods af, at deklorering og sulfat-reduktion kan ske simultant under sådanne forhold, kan den stimulerende effekt ved tilsætning af donor være for lav til at se en effekt på nedbrydningen af klorerede stoffer. Når sulfat til sidst er opbrugt, vil hydrogenniveauet stige for en periode og stimulere væksten af den deklorerende population, hvilket vil medføre, at hydrogenniveauet falder til tærskelniveauet for de deklorerende bakterier. En startreduktion af sulfatniveauet kan forløbe forholdsvis hurtigt, mens der kan være en lagperiode før deklorering starter. Når sulfat er opbrugt kan visse sulfat-reducerende bakterier have evnen til fermentativ vækst på eksempelvis laktat og altså leve som en syntrofisk partner til de hydrogenotrofe deklorerende bakterier.

Konkurrenceforhold mellem dehalogenerende bakterier og nitrat- eller jern(III)-reducerende bakterier er ikke undersøgt i særlig høj grad i systemer med nedbrydning af klorerede stoffer. Ud fra energimæssige betragtninger kan deklorering placeres mellem jern(III)- og nitrat-reduktion baseret på konkurrencen for hydrogen (Löeffler et al., 1999; Yager et al., 1997).

Tabel 3.5. Hydrogen interval angivet som opløst hydrogen for en given terminal elektron accepterende proces. (Efter Lovley et al., 1994; Chapelle et al., 1995)

Terminal elektron-accepterende proces	Opløst hydrogen koncentration		
	nM	atm	µg/L
Denitrifikation	<0,1	<1,3·10 <sup>-7</sup>	<0,2·10 <sup>-3</sup>
Jern(III)-reduktion	0,2-0,8	0,26-1,0·10 <sup>-6</sup>	0,4-1,6·10 <sup>-3</sup>
Sulfat-reduktion	1-4	1,3-5,0·10 <sup>-6</sup>	2,0-8,0·10 <sup>-3</sup>
Metanogenese	5-20	63-250·10 <sup>-6</sup>	10-40·10 <sup>-3</sup>

### 3.5 Nedbrydningsrater

I følgende afsnit præsenteres nedbrydningsrater for anaerob deklorering af klorerede ethener samt 1,1,1-TCA udført i laboratorieforsøg. Referencer er hentet fra både den grå og den videnskabelige litteratur og dækker primært nedbrydningsforsøg udført med grundvand og sediment.

Nedbrydningsraterne samt under hvilke forsøgsbetingelser (forsøgs set-up, tilsat donor, temperatur) disse er fremkommet er vist i tabel 3.6.

Nedbrydningsraterne er ikke umiddelbart sammenlignelige, da de opgives i forskellige enheder i forskellige referencer. I mange referencer er nedbrydningsforløbet blot beskrevet i ord og eventuelt vist grafisk, og der er ikke beregnet en specifik nedbrydningsrate. Dette kan ofte skyldes, at nedbrydningsforløbet ikke er velanalyseret (for få målepunkter), og nedbrydningskinetikken derfor ikke kan afgøres. Sådanne referencer er medtaget nederst i tabel 3.6, hvor der i stedet for en specifik rate fx er beskrevet efter hvor lang tid, der sås en vis procentdel nedbrydning eller, hvor tiden for fuldstændig omsætning til ethen er angivet.

Nedbrydningsraten afhænger af mange forskellige faktorer som typen af elektrondonor, koncentration af donor, næringsstoffer, koncentration af klorerede stoffer, og temperatur, hvorfor det kan være vanskeligt at sammenligne rater fra forsøg, der er udført under forskellige forhold. Nedbrydningsraten vil også afhænge af, hvor mange bakterier, der er tilstede,

hvorfor nedbrydningshastigheden ofte er relateret til biomassen, ofte angivet som gram protein eller gram VSS (volatile suspended solids). Ved sammenligning af nedbrydningsraterne for PCE opgjort per gram biomasse ses en relativ lille variation mellem 0,42 til 1,6  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein/t, mens nedbrydningsraten for vinylklorid ligger mellem 0,11 til 3,36  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein/t (se tabel 3.6). Disse rater er alle opnået i forsøg tilsat bakteriekulturer, der forinden er opdyrket på klorerede stoffer, og derfor er tilvænnet nedbrydning af disse stoffer. Ofte er biomassen dog ukendt og særligt i systemer, hvor der også indgår sediment, kan det være svært at analysere biomassen, da en del sandsynligvis vil være tilknyttet sedimentet. Endvidere skal man være opmærksom på, at det kun er en mindre del af den totale biomasse, der er direkte involveret i nedbrydningen af de klorerede stoffer, med mindre der er tale om en ren monokultur.

Der er udført en del forsøg med sediment og grundvand fra forurenede lokaliteter med det formål at vurdere de naturligt tilstedeværende bakteriers evne til at nedbryde PCE/TCE til ethen. I flere af sådanne forsøg ses kun nedbrydning af TCE til *cis*-DCE. Endvidere forløber nedbrydningen ofte langsomt og først efter en lag periode. Af tabel 3.6 fremgår det, at nedbrydning af TCE til *cis*-DCE er observeret indenfor de første 25 til 75 dage. I andre forsøg ses fuldstændig nedbrydning af TCE til ethen, dog er der observeret meget forskellige nedbrydningshastigheder. I forsøg udført af He et al. (2002) sås fuldstændig nedbrydning af PCE og TCE til ethen indenfor 14 dage uafhængig af, hvilken elektron donor der blev anvendt. Yager et al. (1997) observerede derimod først fuldstændig deklorering af TCE til ethen efter seks måneder. I forsøg, hvor der ikke er opnået fuldstændig deklorering indenfor en vis periode, er tilsat bakterier med formålet at undersøge muligheden for at stimulere processen. Til mange af forsøgene er tilsat bakteriekultur hentet fra en forurenede lokalitet, der efterfølgende er opformeret og dyrket på et næringsmedium tilsat elektron donor og PCE/TCE. I sådanne forsøg kan man opnå høje nedbrydningsrater afhængig af, hvor god bakteriekulturen er til at nedbryde PCE/TCE, og hvor meget af den der tilsættes. I forsøg tilsat bakteriekulturen *KB-1* er observeret fuldstændig nedbrydning af TCE til ethen på mellem 60 til 205 dage (se tabel 3.6). I forsøg tilsat bakteriekulturen Pinella sås fuldstændig nedbrydning af TCE til ethen på mellem 56 til 160 dage (Major et al., 2002).

I teorien burde man på baggrund af termodynamiske betragtninger forvente en aftagende nedbrydningsrate med faldende antal kloratomer tilknyttet til ethen. Denne tendens er også observeret i *in vitro* forsøg, hvor deklorering er forsøgt stimuleret ved tilsætning af metal-holdige cofaktorer (eksempelvis vitamin B<sub>12</sub> og coenzym F<sub>430</sub>), svarende til den mekanisme nogle anaerobe bakterier anvender ved cometabolsk nedbrydning af klorerede ethener (se afsnit 2.1.1). I forsøg med stimulering af halorespirerende bakterier ved tilsætning af elektron donor tegner sig et mere uensartet billede. Castellanos et al. (2002) observerede i batchforsøg med vand og sediment tilsat bakteriekulturen *KB-1* relativ hurtig nedbrydning af TCE, mens nedbrydningen af VC forløb ca. 10 gange langsommere end TCE og 4 gange langsommere end *cis*-DCE. I laboratorieforsøg med jord fra en TCE-forurenede lokalitet fandt El Mamouni et al., (2002), at omsætningen af *cis*-DCE til VC og ethen var det hastighedsbegrænsende trin i nedbrydningen af TCE. Davis et al. (2002) så ligeledes en faldende nedbrydningsrate fra PCE til *cis*-DCE, derimod måltes den højeste nedbrydningshastighed for VC (se tabel 3.6). Andre forsøg indikerer, at TCE omsættes hurtigere end PCE, hvilket bevirker, at der i nedbrydningsforsøg med PCE ikke ses akkumulering af TCE (Tandoi et al., 1994; Yang og McCarty, 2000a).

Generelt ses TCE at nedbrydes hurtigere end *cis*-DCE, hvilket resulterer i akkumulering af *cis*-DCE (Yager et al., 1997; Yang og McCarty, 2000a; Fiacco et al., 2000; Harkness et al., 1999). Harkness et al. (1999) observerede et skift i de relative nedbrydningsrater for klorerede ethener over tiden i kolonneforsøg inokuleret med bakteriekulturen Pinella. Ved tilførsel af TCE i højere koncentrationer over en periode på 510 dage sås en forøgelse af nedbrydningshastigheden for TCE, mens nedbrydningshastigheden for *cis*-DCE og VC faldt (se tabel 3.6). Dette skyldes formentlig et skift i sammensætningen af den mikrobielle population, således at bakterier, der kan anvende TCE i høje koncentrationer, favoriseres. Lignende resultater er opnået af Duhamel et al. (2002), hvor subkulturer af bakteriekulturen **KB-1** dyrket på henholdsvis TCE, *cis*-DCE og VC viste sig at omsætte netop de stoffer, som de var dyrket på med størst nedbrydningsrate. Eksempelvis viste det sig, at **KB-1** dyrket på VC generelt omsatte højere klorerede ethener med langsommere hastighed, og helt mistede evnen til at nedbryde PCE. Lignende resultater er også observeret af Flynn et al. (2000). Samlet tyder dette på, at nedbrydningsraten for forskellige klorerede ethener er afhængig af sammensætningen af den specifikke mikrobielle population. Dette betyder desværre, at generelle konklusioner omkring nedbrydningsrater i naturlige systemer ikke kan drages på baggrund af den eksisterende litteratur.



Tabel 3.6. Nedbrydningsrater for klorerede ethener fundet i laboratorieforsøg

REF <sup>1</sup> Inokulum	System	Elektron donor	Deklorering	Temp. °C	Initial konc. µM	Nedbrydningsrate
<sup>a</sup> Akvifer materiale fra en forurennet lokalitet. Beriget på benzoat, vækstmedie, gærekstrakt, TCE.	B NM	H <sub>2</sub>	VC → E	20	5	VC: 56 nmol/mg of protein/min
<sup>b</sup> Grundvand fra en TCE-forurennet lokalitet. Beriget på glukose.	B NM	Glukose	PCE → E TCE → E VC → E	20-30	PCE: 1200 TCE: 8400 VC: 1400	PCE: 1150 nmol/mg protein/t
<sup>c</sup> Anaerob reaktor oprindelig tilsat sediment fra en PCE-forurennet lokalitet. Beriget på benzoat, gær ekstrakt og PCE	B+K	Pentanol	PCE → E TCE → E <i>cis</i> -DCE → E	22	PCE: 4220 TCE: 2260 <i>cis</i> -DCE: 660	PCE: 0,42 µmol/mg protein/t
<sup>d</sup> Biomasse fra en anaerob nedbrydningstank. Beriget på metanol.	K sand	Metanol gærekstrakt basal medium	PCE → E		PCE: 600	Forsøgsperiode: 610-938 dag Fjernelsesrate for PCE: 0-15 cm: 1896-2481 µmol/L/t = 1,23-1,60 µmol/mg protein/t 0-30 cm: 492-625 µmol/L/t = 0,21-0,26 µmol/mg protein/t 0-45 cm: 385-438 µmol/L/t = 0,11-0,13 µmol/mg protein/t
<sup>e</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurennet lokalitet. Beriget på TCE og metanol. (KB-1/TCE)	B NM	Metanol	PCE/TCE → E	20	100-300	PCE: 3,2 µmol/L/d TCE: 14 µmol/L/d
<sup>f</sup> Anaerob bakteriekultur	B NM	Metanol gærekstrakt	PCE → E	35	550	PCE: 1,25 µmol/100ml TCE: 4 µmol/100ml DCE: 3 µmol/100ml VC: 4,5 µmol/100ml
<sup>g</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurennet lokalitet.	B S+GV	ingen donor	PCE → E	15	PCE: 1500µg/kg TCE: 160µg/kg DCE: 300µg/kg VC: 180µg/kg	PCE: 3,1·10 <sup>-4</sup> day <sup>-1</sup> . T <sub>1/2</sub> = 6,1 år TCE: 6,7·10 <sup>-5</sup> day <sup>-1</sup> . T <sub>1/2</sub> = 28 år DCE: 6,2·10 <sup>-6</sup> day <sup>-1</sup> . T <sub>1/2</sub> = 306 år VC: 1,1·10 <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> . T <sub>1/2</sub> = 0,2 år
<sup>h</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurennet lokalitet.	B S+NM	Metanol laktat	TCE → E	20	TCE: 10mg/L	TCE: 44 nmol/g soil/d <i>cis</i> -DCE: 7 nmol/g soil/d
<sup>i</sup> Sedimentkerner fra en TCE-forurennet lokalitet.  Pinellas culture	K S+GV	Mælkesyre metanol vitaminer gærekstrakt	TCE → VC/E		Day 200: TCE: 29 Day 325: TCE: 227 Day 511: TCE: 1297	Day 200: TCE: 46 µM/t, DCE: 78µM/t, VC: 276µM/t Day 325: TCE: 47 µM/t, DCE: 22µM/t, VC: 28µM/t Day 511: TCE: 210 µM/t, DCE: 24µM/t, VC: 11µM/t
<sup>j</sup> Sediment og grundvand fra en lokalitet forurennet med klorerede opløsningsmidler.	B S+GV	Toluen	TCE → <i>cis</i> -DCE	20	10µg/L	0,03 µmol/g soil/d
<sup>k</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurennet lokalitet. Beriget på laktat og TCE.	B	Laktat	TCE → E	25-30	200-400	Fuldstændig nedbryd. af TCE til ethene indenfor 10 dage
<sup>l</sup> Sediment fra en TCE-forurennet lokalitet.	B S+GV	Laktat	TCE → <i>cis</i> -DCE		5mg/L	Nedbryd. af TCE til <i>cis</i> -DCE kunne observeres efter 75 dage

<sup>m</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet.	B S+GV	Laktat butyrat benzoat propionat gærekstrakt vitamin B <sub>12</sub>	TCE → VC/E	24	200	Nedbryd. af TCE til <i>cis</i> -DCE efter 50 dage og fuldstændig nedbryd. til VC og ethen efter 100 dage.
<sup>n</sup> Sediment og grundvand fra en lokalitet forurenede med klorerede opløsningsmidler (Bachman Road)	B S+GV	H <sub>2</sub> , format acetat pyruvat laktat fumarat glycerol glukose melasse valle	PCE → E TCE → E <i>cis</i> -DCE → E VC → E	25	20-50	Fuldstændig nedbrydning af PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE og VC til ethen indefor 14 uger uafhængig af donortype
<sup>o</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet.	B GV+NM	Gærekstrakt pulveriseret dolomit	TCE → E	22	200	Nedbryd. af TCE til <i>cis</i> -DCE indenfor en måned. Fuldstændig nedbryd. af TCE til ethen efter 6 måneder. TCE: 3,9 år <sup>-1</sup> <i>cis</i> -DCE: 1,9 år <sup>-1</sup>
<sup>p</sup> Sediment og grundvand fra en PCE-forurenede lokalitet. <i>KB-1</i> -culture	B S+GV	Metanol laktat	TCE → <i>cis</i> -DCE TCE → VC/E		600	Nedbryd. af TCE til <i>cis</i> -DCE indefor 25 dage. Ved tilsætning af <i>KB-1</i> sås fuldstændig nedbrydning af TCE til ethen mellem 60 til 150 dage
<sup>q</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet. <i>KB-1</i> -culture	B S+GV	Metanol ethanol acetat laktat (MEAL)	TCE → <i>cis</i> -DCE TCE → E	25	20-25mg/L	Nedbryd. af TCE til <i>cis</i> -DCE efter en inkubations-periode på 126 dage. Ved tilsætning af <i>KB-1</i> -kultur sås fuldstændig nedbrydning af TCE til ethen efter 205 dage. Gennemsnitlige halveringstider. TCE: T <sub>1/2</sub> =4d, <i>cis</i> -DCE: T <sub>1/2</sub> =15d, VC:T <sub>1/2</sub> =39d.
<sup>r</sup> Sediment og grundvand fra en TCE-forurenede lokalitet. Pinellas-culture	B S+GV	Laktat melasse soybean oil gærekstrakt	TCE→ <i>cis</i> -DCE/VC TCE → E	22	200	Nedbryd. af TCE til <i>cis</i> -DCE over en periode på 27 uger. Ved tilsætning af Pinellas kultur sås fuldstændig nedbrydning af TCE til ethen mellem 8 til 20 uger.
<sup>s</sup> Sediment og grundvand fra en 1,1,1-TCA-forurenede lokalitet.	B S+GV	HRC™	TCE → E 1,1,1-TCA → E		TCE: 25mg/L TCA: 250 mg/L	Nedbryd. af TCE (mellem 68-80% af startkoncentrationen) på 28 dage. Nedbryd. af 1,1,1-TCA (op til 92% af startkoncentrationen) på 28 dage.

Forkortelser: B: batch, K: kolonne, S: sediment, GV: grundvand, NM: næringsmedium.

Referencer: <sup>a</sup>Cupples et al., 2003; <sup>b</sup>Nielsen og Keasling, 1999; <sup>c</sup>Yang og McCarty, 2000a; <sup>d</sup>Isalou et al., 1998; <sup>e</sup>Duhamel et al., 2002; <sup>f</sup>Tandoi et al., 1994; <sup>g</sup>Davis et al., 2002; <sup>h</sup>El Mamouni et al., 2002; <sup>i</sup>Harkness et al., 1999; <sup>j</sup>Skubal et al., 2001; <sup>k</sup>Richardson et al., 2002; <sup>l</sup>Ellis et al., 2000; <sup>m</sup>Fennell et al., 2001; <sup>n</sup>He et al., 2002; <sup>o</sup>Yager et al., 1997; <sup>p</sup>Major et al., 2002; <sup>q</sup>Castellanos et al., 2002; <sup>r</sup>Fiacco, et al., 2000; <sup>s</sup>Dick et al., 2001.

### 3.6 Styrende faktorer

#### 3.6.1 Næringsstoffer

Mange af de haloinspirerende bakterier er ofte dyrket med gærekstrakt i vækstmediet, men det er endnu usikkert, om de haloinspirerende bakteriers vækst er direkte afhængig af specifikke komponenter, der findes i gærekstrakt. Ved tilsætning af gærekstrakt vil denne fermenteres, og den dannede hydrogen kan indirekte stimulere dekloreringsprocessen. Opformering af bakteriestammerne *Dehalobacter restrictus* PER-K23 og *Dehalococcoides ethenogens* strain 195 er kun lykkedes ved tilsætning af vomsaft (rumen fluid), fermenteret gærekstrakt eller supernatant fra en anaerob nedbrydningstank til deres vækstmedium. Vækst af *Dehalobacter restrictus* PER-K23 er yderligere afhængig af tilsætning af vitaminerne thiamin og cyanocobalamin, samt aminosyrerne arginin, histidin og threonin. *Dehalococcoides ethenogens* strain 195 kræver vitamin B<sub>12</sub> samt andre endnu ukendte vækstfaktorer (Maymó-Gatell et al., 1997). Endvidere er det foreslået, at tilstedeværelsen af metanogene bakterier kan være af betydning, da disse producerer vitaminer som B<sub>12</sub> samt andre cofaktorer, der er til gavn for de deklorerende bakterier (Mohn og Tiedje, 1992).

### 3.6.2 pH

Anaerobe systemer, hvori der forløber deklorering, fungerer bedst mellem pH 6 og pH 8 (Fennel og Gossett, 2003; Middeldorp et al., 1999). De fleste laboratorieforsøg indikerer da også et pH-optimum for anaerob deklorering omkring neutrale pH-værdier. I en serie forsøg med en beriget bakteriekultur indeholdende *Dehalococcoides*, forløb deklorering af PCE fire gange langsommere ved pH 6 og to gange langsommere ved pH 8 i forhold til ved pH 7 (Young og Gosset, 1997). Ved fermentering af elektrondonorer dannes fede syrer og kulsyre, som kan føre til en forsuring, hvis systemets egen pH-bufferkapacitet er utilstrækkelig. Forsuring og efterfølgende inhibering af PCE-deklorering blev observeret i et storskalaforsøg udført i en sandbox inokuleret med *Dehalospirillum multivator* samt en blandet DCE-deklorerende kultur, da pH faldt til 5,5 som følge af omsætning af ethanol. Tilsætning af buffer formindskede i nogen grad denne effekt (Cirpka et al., 1999). Akviferer med pH-værdier lavere end 5 eller højere end 9 er derfor mindre gode kandidater til anvendelse af anaerob deklorering. I akviferer med lav alkalinitet kan det være nødvendig at tilsætte buffer for at undgå forsuring.

### 3.6.3 Temperatur

De fleste forsøg med anaerob deklorering er udført ved temperaturer indenfor det mesofile område dvs ved temperaturer mellem 20 til 37°C (se tabel 3.6 samt appendiks A.1.). Anaerob deklorerering er også set under termofile forhold. Kengen et al. (1999) observerede nedbrydning af PCE til *cis*-DCE i en opformeret bakteriekultur med temperatur optimum på 65°C. Der er derimod udført langt færre forsøg under lavere temperaturer (<20°C), således at eksperimentelle erfaringer for temperaturer omkring 10°C, som er gældende under danske forhold, er meget begrænsede. Da anaerob deklorering er en mikrobiel medieret proces er det forventeligt at lavere temperaturer vil medføre en lavere nedbrydningshastighed. I laboratorieforsøg tilsat PCE observeredes et signifikant fald i nedbrydningsraten, når forsøget blev kørt ved 12°C sammenlignet med ved 22°C. Endvidere sås kun nedbrydning af PCE til TCE ved 12°C i modsætning til ved 22°C, hvor PCE blev omsat til *cis*-DCE (Adamson et al., 2003). Ved anvendelse af *in situ* stimulering af anaerob deklorering i koldere egne med grundvandstemperaturer omkring 10°C eller lavere er en længere oprensningsperiode forventelig pga. den langsommere nedbrydning.

### 3.6.4 Inhibering på grund af andre forureningskomponenter

Tilstedeværelsen af andre toksiske organiske forureningskomponenter som fx kloroform, cyanid eller toksiske tungmetaller kan have en inhiberende effekt på de deklorerende bakterier eller på andre aktive bakterier i det mikrobielle samfund. Under reducerende forhold vil dannelsen af sulfider sandsynligvis mindske den toksiske effekt af tungmetaller pga. udfældning med frie metalioner. Modsat kan et fald i pH som følge af fermentering, dannelse af organiske syrer og kulsyre mobilisere tungmetaller i jorden.

Flere laboratoriestudier tyder på, at tilstedeværelsen af klorerede metaner har en hæmmende virkning på nedbrydning af klorerede ethener under anaerobe forhold. Adamson og Parkin (2000) har undersøgt indflydelsen af 1,1,1-TCA og tetraklormetan på en PCE-nedbrydende kultur. De fandt, at mens 1,1,1-TCA (<20µM) ingen effekt havde på nedbrydningen af PCE, hæmmede tilsætning af tetraklormetan (10-15µM) både nedbrydningen af PCE samt

nedbrydningen af VC. Lignende resultater er fundet af Bagley et al. (2000) som observerede total inhibering af nedbrydningen af PCE ved tilsætning af henholdsvis 19 $\mu$ M tetraklormetan og 4 $\mu$ M kloroform. Kaseros et al. (2000) observerede ligeledes hæmning af nedbrydningen af PCE ved tilsætning af tetraklormetan og kloroform, men hæmningen var kun tilstede i en overgangsfase indtil den PCE-nedbrydende bakteriekultur var akklimatiseret til tetraklormetan og kloroform.

Andre organiske forureningskomponenter som fx olieforbindelser eller organiske opløsningsmidler som acetone eller metanol kan i nogle tilfælde stimulere nedbrydning af klorerede stoffer. Nedbrydning af sådanne stoffer kan dels bidrage til at reducere forholdene samtidig med, at nedbrydningsprodukter kan optræde som elektrondonorer og stimulere anaerob deklorering.

### 3.6.5 Betydning af koncentration og fri fase af opløsningsmidler

Hæmning af de halorespirerende bakterier ved høje koncentrationer af klorerede stoffer er af betydning for anvendelsen af stimuleret anaerob deklorering til oprensning i kildeområdet såvel som i forureningsfanen tæt på kilden, hvor de klorerede stoffer kan forventes at være tilstede i høje koncentrationer. Laboratorieforsøg har vist, at høje koncentrationer ikke er inhiberende for visse typer af deklorerende bakterier (Yang og McCarty, 2000a; Nielsen og Keasling, 1999). Faktisk tyder det på, at visse deklorerende bakterier kan trives i nærheden af kildeområdet, og at disse bakterier har en konkurrencemæssig fordel ved høje koncentrationer af klorerede stoffer frem for andre mikroorganismer (Yang og McCarty, 2000a; Cope & Hughes, 2001). Yang og McCarty (2000a) har vist, at høje koncentrationer af PCE og *cis*-DCE kan have en direkte hæmmende effekt overfor metanogene og homoacetogene bakterier, og konkluderede, at en sådan hæmmende effekt vil være til gavn for de deklorerende bakterier, da konkurrencen for elektrondonor reduceres.

Modellering foretaget af (Seagren et al., 1994), forudsiger, at den stimulerede biologiske nedbrydning af ethener vil medføre lavere koncentrationer ved grænsefladen mellem den frie fase af opløsningsmiddel og vandfasen, hvorved koncentrationsgradienten mellem fri fase og vand øges og dermed opløsningshastigheden af den frie fase. Endvidere kan den reductive nedbrydning af PCE medvirke til yderligere opløsning, da de dannede nedbrydningsprodukter (TCE, *cis*-DCE og VC) alle har højere opløselighed end PCE. Carr et al. (2000) har vist, at nedbrydning af PCE til *cis*-DCE ved tilstedeværelse af DNAPL (12% PCE i tridecan) øgede opløsningshastigheden af DNAPL med en faktor 14. Efterfølgende forsøg har vist, at nedbrydning med en deklorerende bakteriekultur forøgede opløsningshastigheden af klorethen-DNAPL med en faktor 5 til 6.5 (Cope og Hughes, 2001). Yang og McCarty (2000a) observerede, at opløselighedshastigheden af en PCE DNAPL i en kontinuert-flow kolonne øgedes med en faktor 5 efter inokulering med en deklorerende bakteriekultur.

### 3.7 Treatability-test

Til vurdering af potentialet for anvendelse af stimuleret reaktiv deklorering på en specifik forurenede lokalitet kan der udføres laboratorieforsøg. Laboratorieforsøgene søger at simulere forholdene i felten og udføres ofte med både sediment og grundvand fra den pågældende lokalitet.

Laboratorieforsøgene udføres ofte som batchforsøg dvs. i lukkede, totalt opblandede beholdere, da sådanne forsøg er relative nemme at sætte op og håndtere. Sådanne nedbrydningsforsøg omtales på engelsk ofte som treatability-test. Alternativt kan treatability-tests udføres som søjleforsøg, hvor grundvand ledes gennem en søjle pakket med sediment. Søjleforsøg simulerer på flere måder bedre de naturlige forhold i en akvifer, men er også sværere at kontrollere. Forsøgene er dyrere end flaskeforsøg, og der udføres ofte kun et begrænset antal.

Treatabilitytest kan først og fremmest vise, om der på den pågældende lokalitet er bakterier tilstede, der kan deklorere PCE eller TCE fuldstændigt til ethen. På flere forurenede lokaliteter ses akkumulering af nedbrydningsprodukterne *cis*-DCE og i nogle tilfælde også VC (se diskussion i afsnit 2.1.1). Ved tilsætning af forskellige elektrondonorer undersøges muligheden for at stimulere en eventuel nedbrydning. Treatabilitytest kan endvidere belyse, hvorledes de tilsatte elektrondonorer fermenteres med henblik på at optimere nedbrydningen af de klorerede stoffer. For eksempel kan fermentation af laktat og ethanol føre til høje hydrogen koncentrationer (jvf. tabel 3.2), der kun vil være til rådighed for de deklorerende bakterier i en relativ kort periode pga. konkurrencen fra forskellige hydrogenforbrugende organismer. Under nogle forhold kan laktat og ethanol dog fermenteres til propionat, der selv langsomt fermenteres og resulterer i lave hydrogenkoncentrationer, hvilket betyder at laktat og ethanol kan være gode donorer på nogle lokaliteter. Endvidere kan laboratorieforsøg belyse behovet for tilsætning af næringsstoffer eller buffer.

Treatabilitytest kan belyse følgende:

- Er der deklorerende bakterier naturligt tilstede, som kan deklorere PCE eller TCE til ethen, eller opnås der kun delvis deklorering med følgende akkumulering af skadelige nedbrydningsprodukter?
- Hvilke elektrondonorer stimulerer mest effektivt dekloreringsprocessen?
- Efter hvilken nedbrydningsvej vil tilsat elektron donor fermenteres?
- Er der andre elektronacceptorer til stede, der vil bidrage til forbruget af elektron donor?
- Hvor meget elektron donor skal tilsættes?
- Er der faktorer, der kan hæmme dekloreringsprocessen?

Treatabilitytest kan give information om hvorvidt anaerob deklorering er en egnet afværgestrategi for en helt specifik lokalitet. I tilfælde af, at der på trods af tilsætning af donor ikke ses fuldstændig omsætning til ethen, kan det være nødvendigt at tilsætte bakterier for at opnå den ønskede effekt. Dette er en vigtig information inden et afværgeprojekt igangsættes. I følgende afsnit behandles opsætning og analyse af nedbrydningsforsøg til at undersøge potentialet for at anvende stimuleret anaerob deklorering til oprensning af PCE/TCE-forurenede grunde. Afsnittet er skrevet på baggrund af anbefalinger for treatability test skrevet af Morse et al. (1998) og forsøg beskrevet i litteraturen, samt erfaringer gjort ved opsætning af sådanne forsøg på Miljø & Ressourcer DTU.

### 3.7.1 Sediment- og grundvandsprøvetagning

Til nedbrydningsforsøgene anvendes sediment og grundvand fra den forurenede lokalitet. Tilsætning af sediment er af betydning, da oxiderede jern og mangan forbindelser på sedimentet vil bidrage til forbruget af elektron donor. Yderligere forventes det, at de fleste bakterier er knyttet til sedimentet.

Der findes forskellige teknikker til udtagning af sedimentprøver afhængig af de geologiske forhold (Amternes Videncenter for Jordforurening, 2003). Det er vigtigt, at der ved udtagningen undgås kontakt med atmosfærisk luft. Ved udtagning af sedimentkerner kan anvendes rengjorte metalrør, der straks efter optagningen forsegles i enderne, så diffusion af ilt ind i prøvematerialet minimeres. Ved prøvetagning er det endvidere vigtigt at undgå krydskontaminering mellem boringer fx ved anvendelse af samme boreudstyr. I sådanne tilfælde skal boreudstyret rengøres mellem hver boring. Sedimentkernerne opbevares på køl ved 4°C, indtil opsætning af forsøg kan finde sted. Sedimentkernerne bør opbevares så kort tid som muligt, inden forsøgene sættes op for at minimere ændringer i det mikrobielle samfund.

Ved udtagning af grundvandsprøver er det vigtigt, at disse repræsenterer det geokemiske miljø, som er gældende der, hvor sedimentprøverne er udtaget. Grundvandsprøver udtages tæt på, hvor der er udtaget sedimentprøver og i samme dybde. Ved udtagning af vandprøver er det ligeledes vigtigt, at der undgås kontakt med atmosfærisk luft. Valget af pumpe vil afhænge af de hydrogeologiske forhold bl.a. hvor dybt prøven skal tages samt vandtilstrømningen til boringen. Det har vist sig, at flere jævnstrømspumper som fx Whalepumper udvikler hydrogen under prøvetagningen, idet vand spaltes ved elektrolyse til hydrogen, som i så fald vil bidrage til elektrondonorpuljen i nedbrydnings-forsøgene (Chapelle et al., 1997; pers. komm. m. Rasmus Jakobsen, M&R DTU). Vandprøverne udtages i rengjorte sterile glasflasker, der fyldes helt op ved overløb og lukkes med et tæt låg med indlæg af Teflon® for at undgå tab ved sorption.

### 3.7.2 Opsætning af flaskeforsøg

Nedbrydningsforsøgene udføres i sterile flasker, der lukkes med gastætte propper (fx butylgummi-propper med Teflon® indlæg og aluminiumskrave). Til flaskerne tilsættes en blanding af sediment og grundvand. Mængden af vand, der tilsættes, bestemmes ud fra antallet af analyser, der ønskes udtaget i løbet af forsøget. Til bestemmelse af vandmængden, bør der derfor laves en forsøgsplan med angivet prøvemængder, der ønskes udtaget, så det sikres, at der er vand nok til hele forsøget. Ønskes der udtaget prøver af sedimentet til analyse eller udføres andre destruktive analyser, kan det være nødvendigt at sætte flere identiske flaskeforsøg op, der så kan prøvetages og kasseres over tiden (såkaldte høstforsøg). Ved opsætning af høstforsøg kan man komme tættere på det naturlige forhold mellem sediment og grundvand. Opsætning af høstforsøg er dog mere omstændelig, idet der ofte skal sættes et større antal forsøg op for at følge udviklingen over tid. Ved opsætning af høstforsøg kræves endvidere en større mængde prøvemateriale, hvilket der skal tages højde for ved prøvetagning. Der vil ved høstforsøg også ofte være en vis variation mellem flaskerne, hvilket kan medføre en større variation på data. Dette kan være særlig udtalt med mikrobielle forsøg, hvor mikroorganismene fx ikke er homogent distribueret i sedimentmaterialet.

Oplukning af sedimentprøver samt den efterfølgende opsætning af forsøg foregår i en anaerob handskeboks, der indeholder en atmosfære af nitrogen samt ofte 1 til 3% hydrogen. Ved udtagning af sedimentkerner fjernes ca. 5cm af kernen i begge ender, da dette kan have været eksponeret til ilt. Ved opsætning af replikater er det vigtigt, at sedimentet homogeniseres for at undgå variation mellem flasker. Alle redskaber, opblandingsbakker og prøvebeholdere steriliseres før start. Efter tilsætning af sediment og grundvand lukkes flaskerne og fjernes fra den anaerobe boks. Flaskerne skylles med

nitrogen (evt. 20%CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub>-blanding) for at fjerne hydrogen stammende fra anaerob boksen.

For at sikre optimal tilsætning af bl.a. klorerede stoffer og elektrondonor er det en god ide, at vandprøverne analyseres inden start. Tilsætning af PCE eller TCE vil afhænge af koncentrationen af stofferne i det forurenede grundvand. Ideelt bør startkoncentrationen afspejle koncentrationerne i det forurenede grundvandsmagasin. I praksis vil lave koncentrationer (under 0,5 mg/l) besværliggøre fortolkningen, da der kan være problemer med at sikre en ordentlig analyse af både moderprodukter og nedbrydningsprodukter gennem hele forløbet på grund af de små vandvolumener, der er til rådighed for analyse (se 3.10.3). Startkoncentrationen bør samtidig være lav nok til at hindre toksiske effekter på de mikrobielle processer.

I tilfælde af at bufferkapaciteten er lav i systemet, er det foreslået at tilsætte NaHCO<sub>3</sub> som buffer for at undgå forsuring i løbet af forsøget (Fennel og Gosset, 2003). Endvidere kan det være en mulighed at tilsætte resazurin som redoxindikator. Resazurin er farveløs ved redoxpotentialer lavere end -110mV, men skifter farve til lyserød ved højere redoxværdier. For at undgå en toksisk virkning tilsættes resazurin i en koncentration lavere end 1mg/L.

Valget af elektrondonor vil ofte afhænge af, hvad man i den enkelte situation har påtænkt at tilsætte i felten. Det drejer sig både om en vurdering af det påtænkte injektionssystem og de hydrauliske forhold på lokaliteten (se afsnit 4.4.1) Tilsætning af laktat kan derfor anbefales, idet man med stor sandsynlighed og relativt hurtigt vil se en nedbrydning, såfremt de rette bakterier er tilstede. Endvidere kan det være en god ide at inkludere et par andre substrater som fx butyrat og benzoat, der fermenteres langsommere under dannelse af lave koncentrationer af hydrogen. Hvor mange elektrondonorer man ønsker at inkludere i sit forsøgsset-up afhænger mest af tidsrammen og økonomien. Såfremt man påtænker at tilsætte komplekse substrater, fx et restprodukt, som ikke er undersøgt tidligere, er det vigtigt at disse testes i nedbrydningsforsøg inden tilsætning i felten. Tabel 3.7 viser et eksempel på en forsøgsopsætning.

Ved tilsætning af elektrondonor skal der tages højde for et donorforbrug fra andre konkurrerende elektronacceptorer (som fx nitrat, mangan, jern, og sulfat). Beregning af dette kræver dog kendskab til grundvandskemi samt sedimentets oxidationskapacitet med hensyn til jern og mangan. Typiske elektrondonor koncentrationer er på 2-5mM (se tabel 3.1), men det vil afhænge af forsøgsdesignet (fx forholdet mellem sediment og vand), så der bør altid udføres en konkret beregning på baggrund af de støkiometriske forbrug. Eksempler på sådanne beregninger for dimensionering af elektrondonorforbrug under feltforhold ses i tabel 4.2 og Miljøstyrelsen (2003).

Udover forsøg med tilsætning af elektrondonor er det vigtigt, at der udføres forskellige kontrolforsøg. Kontrolforsøgene inkluderer abiotiske og biotiske kontrolflasker. De abiotiske kontrolflasker er vigtige, da de kan vise, om der er tab fra flaskerne, der ikke skyldes biologiske processer fx sorption, tab gennem propper mm. Flaskerne kan steriliseres ved autoklavering. I så fald autoklaveres flaskerne tre gange over tre dage før tilsætning af PCE og TCE. En anden metode kan være tilsætning af kviksølvklorid, her bør man dog være opmærksom på at bidraget af klorid herfra vil vanskeliggøre senere analyse og massebalance på klorid. Til de biotiske kontrolforsøg tilsættes ikke elektrondonor, og disse forsøg repræsenterer derfor den mikrobielle

baggrundsaktivitet uden stimulering. I tabel 3.7 er foreslået, at der yderligere opsættes forsøg, hvor der tilsættes næringsstoffer i form af gærekstrakt og vitamin B<sub>12</sub>, men ingen elektrondonor. Disse forsøg vil vise, om de bakterier, der er tilstede under naturlige forhold, er begrænset af næringsstoffer og ikke af mangel på elektrondonor.

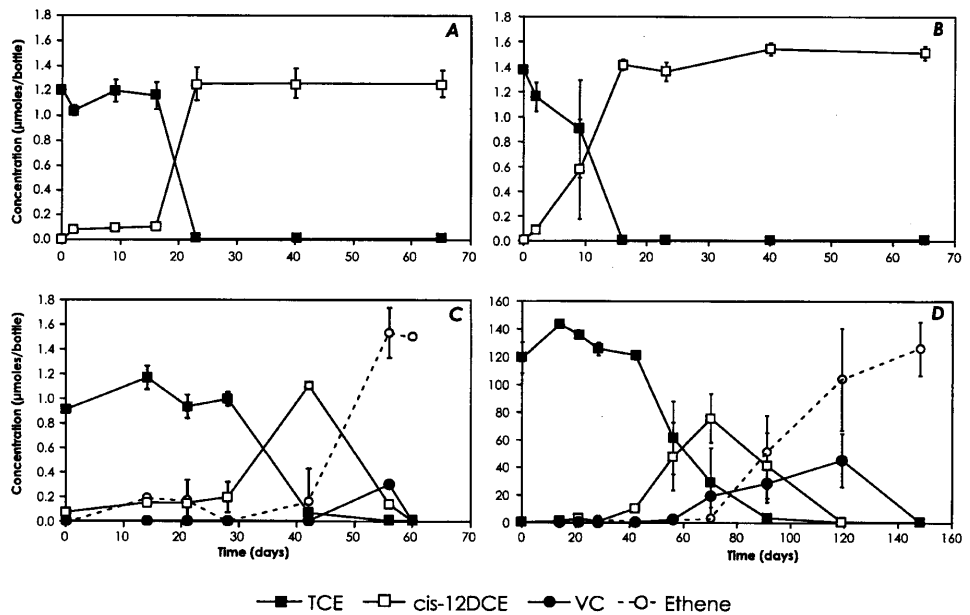
Flere studier tyder på, at gærekstrakt og vitamin B<sub>12</sub> er vigtige næringsstoffer for *Dehalococcoides ethenogens*, og det kan derfor være en mulighed at medtage flasker, hvor disse stoffer tilsættes. I tabel 3.7 er også inkluderet forsøg med tilsætning af høje koncentrationer af gærekstrakt for at screene et antal forskellige donorer's effekt, der ikke kan testes individuelt. Gærekstrakt indeholder en blanding af mange forskellige donorer, og endnu flere kan dannes ved fermentering. Sådanne forsøg kan vise om deklorering er mulig ved tilsætning af andre donorer end dem, der specifikt testes for.

Tabel 3.7. Eksempel for opsætning af treatabilitytest til undersøgelse af stimuleret reduktiv deklorering (Fennell og Gosset, 2003)

Flaske	Elektrondonor	Gærekstrakt (20mg/L)	Vitamin B <sub>12</sub> (0,05mg/L)
1	Ingen (Abiotisk kontrol – autoklaveret)	Nej	Nej
2	Ingen (Biotisk kontrol)	Nej	Nej
3	Ingen	Ja	Ja
4	Gærekstrakt (200mg/L)	Nej	Ja
5 (A)	Laktat (3 mM)	Nej	Nej
5 (B)	Laktat (3 mM)	Ja	Nej
5 (C)	Laktat (3 mM)	Nej	Ja
5 (D)	Laktat (3 mM)	Ja	Ja
6	Donor 2 – Butyrat (3mM)	Ja	Ja
7	Donor 3 – Benzoat/laktat-blanding (1,5 mM af hver)	Ja	Ja
8	Donor 4 – Propionat (3 mM af hver)	Ja	Ja

Såfremt at der ikke ses nedbrydning af de tilsatte stoffer eller, at der kun ses ufuldstændig deklorering fx nedbrydning af PCE/TCE til *cis*-DCE, kan et andet formål med treatability test være at undersøge, om nedbrydningen kan stimuleres ved tilsætning af en bakteriekultur, der vides at kunne nedbryde klorerede ethener til ethen. Et eksempel på nedbrydningsforsøg med TCE tilsat elektrondonor og bakterier er vist i figur 3.2. Ved tilsætning af anaerobe bakterier er det vigtigt, at der er reducerede forhold i forsøgsflaskerne. Hvor meget bakteriekultur, der skal tilsættes, vil afhænge af celledensiteten i den pågældende bakteriekultur. Beskrivelsen af tilsætning af bakteriekultur er ofte mangelfuld, hvilket sandsynligvis skyldes, at man tit ikke har et særligt godt kendskab til bakteriekulturen, og fx ikke kender celledensiteten. Yderligere angives sjældent, hvor meget bakteriekultur, der er tilsat. Med udgangspunkt i en anaerob bakteriekultur (**KB-1**, se tabel 2.6) med en relativ høj celledensitet 10<sup>8</sup> til 10<sup>9</sup> celler/ml foreslår GeoSyntec/SIREM vejledende, at der tilsættes mellem 100 og 1000µL kultur til et mikrokosmos-forsøg (300 ml flasker, personlig kommunikation Phil Dennis). Såfremt formålet med forsøget blot er at få afgjort, om der er et potentiale for nedbrydning, kan der eventuelt tilsættes en højere bakteriekoncentration for at forkorte forsøgsperioden. Et sådant forsøg vil i mindre grad simulere forholdene ved tilsætning af bakterier under feltforhold, hvor bakteriekoncentrationen formentlig vil være lavere.





Figur 3.2. Nedbrydning af TCE i batchforsøg med sediment og grundvand fra Kelly Air Force Base (Texas) tilsat elektrondonor og bakteriekultur *KB-1*. A: tilsat metanol, B: tilsat laktat, C og D: tilsat metanol og bakteriekultur *KB-1*. Startkoncentrationen af TCE i forsøgene vist på figur A,B, C var  $6\mu\text{M}$  ( $0,8\text{ mg/l}$ ) i vandfasen, mens TCE koncentrationen i forsøgene vist på figur D var  $600\mu\text{M}$ . Datapunkterne i figurerne repræsenterer et gennemsnit af tre nedbrydningsforsøg (Major et al., 2002).

### 3.7.3 Inkubation og udtag til analyser

Flaskerne inkuberes i mørke og vendes forsigtigt med jævne mellemrum for at sikre total opblanding i flaskerne. Flaskerne inkuberes ved den aktuelle grundvandstemperatur målt i felten. Dette er særligt vigtigt i koldere egne med lavere grundvandstemperaturer, da nedbrydningen under sådanne forhold formentlig vil forløbe langsommere. De tilstedeværende bakterier kan endvidere være adapteret til lavere temperaturer, og vil i så fald umiddelbart klare sig dårligere ved højere temperaturer.

Forsøgsflaskerne analyseres rutinemæssigt (i starten fx en gang om ugen) for klorerede ethener, tilsatte elektrondonorer, flygtige fede syrer, metan og hydrogen. Prøver til analyse udtages fra gas- eller vandfasen med en kanyle. Flygtige komponenter som de klorerede ethener, metan og hydrogen kan analyseres ved udtag af gasprøver til analyse ved gaskromatografi. Udtag fra gasfasen (0,2-1ml) foretages med en steril gastæt sprøjte udstyret med en ventil, der omhyggeligt lukkes inden prøven trækkes ud af flasken. Væskeprøver til analyse for flygtige fede syrer udtages med sterile engangssprøjter (0,5-2ml). Skal prøverne opbevares, skal de filtreres, syrekonserves (10L 8N  $\text{H}_3\text{PO}_4$  per 0,5ml prøve) og gemmes på køl ( $4^\circ\text{C}$ ). Gentagne udtag af gas- og vandprøver fra samme forsøgsflasker vil med tiden opbygge et undertryk i prøveflaskerne. For at undgå indtrængen af ilt er det vigtigt, at undertrykket løbende udlignes ved tilsætning af nitrogengas. Nitrogen tilsættes med en steril sprøjte, og der holdes regnskab med, hvor meget der er tilsat.

Ønskes analyser af sedimentet (sulfid- eller jernudfældninger, mikrobielle karakteriseringer) eller målinger af pH eller Eh, som kræver åbning af flasken, er det nødvendigt, at opsætte flere forsøgsflasker, der kan høstes over tiden.

Ved gentagne udtag af prøver med en kanyle er der en risiko for, at flaskerne med tiden bliver utætte. Udtag af prøver bør derfor fordeles jævnt over hele

nedbrydningsforløbet. I forsøg, hvor der observeres nedbrydning af *cis*-DCE til VC, bør forsøgene fortsættes så længe, at man sikrer sig, at VC også omdannes videre til ethen. Litteraturgennemgang viser, at forsøgsperioden kan være meget varierende mellem forskellige studier. I batchforsøg udført med sediment og grundvand er der set fuldstændig nedbrydning af PCE og TCE til ethen indenfor 14 dage, mens andre forsøg har kørt op til seks måneder, før der sås dannelse af ethen (He et al., 2002; Yager et al., 1997) (se afsnit 3.5). Ved tilsætning af bakterier vil forsøgsperiodens længde som tidligere nævnt være meget afhængig af, hvor mange bakterier, der tilsættes, og hvor aktive de er. I tilfældet af, at der er stor usikkerhed omkring nedbrydningshastigheden, kan det være nødvendigt at opsætte et indledende forsøg.

#### 3.7.4 Databehandling

Ved opstilling af massebalance for de klorerede stoffer skal der tages hensyn til stoffernes fordeling i de forskellige faser: vand, sediment, og gas. Yderligere skal koncentrationerne korrigeres for volumenændringer som følge af udtag af vand og gas-prøver. Massebalancen opstilles typisk i totale masser for hele systemet og regnes i mol.

## 4 Pilot- og fuldskala erfaringer med stimuleret nedbrydning

På basis af den tilgængelige litteratur, præsenterer dette kapitel en oversigt over de erfaringer, der er gjort med pilotforsøg og fuldskala anvendelse af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering.

### 4.1 Oversigt over felterfaringer

Litteraturindsamlingen for felterfaringer fremgår af appendiks A.2 Der er i alt udvalgt 62 artikler, der beskriver pilot- og/eller fuldskalaoprensninger. De artikler, der er vurderet som de mest betydningsfulde, er markeret med gult.

Der foreligger en stor mængde litteratur, der beskriver oprensninger med benyttelse af stimuleret biologisk nedbrydning af klorerede opløsningsmidler i grundvand, men kun 9 referencer stammer fra artikler i tidsskrifter med censur. Disse giver typisk mere detaljerede oplysninger mht. kravene til verificering af metoden, herunder hydrauliske vurderinger (bl.a. fortynding), massebalancer og vurderinger af betydningen af selve bakteriekulturen.

#### 4.1.1 Lande hvor der er gennemført oprensninger

Det er alt overvejende i Nordamerika, at man har erfaring med pilot- eller fuldskalaoprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. I videnskabelige artikler har vi kun fundet erfaring med pilot- eller fuldskaloprensninger i USA. Af disse har vi vurderet at Ellis et al. (2000), Lendvay et al. (2003) og Major et al. (2002) er de væsentligste eksempler.

I den øvrige litteratur er der fundet erfaringer med metoden i Holland (Marnette et al., 2001; Henssen et al., 2001; Langenhoff et al. 2001, se også appendiks G) og i Japan (Nakashima et al., 2002). Heraf er det vores vurdering, at Henssen et al. (2001) er en af de væsentligste referencer.

I Danmark er der kun ét projekt, hvor der er gennemført pilotforsøg med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering (Jægersborg Allé i København). Der blev anvendt HRC som elektrondonor, men projektet gav ikke den ønskede stimulering af den anaerobe deklorering (Jacobsen et al., 2002; Miljøstyrelsen, 2003a).

#### 4.1.2 Hvad kan oprensnes?

Indtil dato har de fleste afværgeprojekter været gennemført i forureningsfaner frem for i selve kilden (Ellis et al. 2000). Fjernelse af den frie fase anbefales altid forud for en oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. Metoden er dog afprøvet i forhold til kildeoprensning (McMaster et al. 2002; 2003), men metoden er endnu ikke fuldt udviklet til dette formål.

Stimuleret *in situ* reduktiv deklorering er ikke underbygget mht. effektiviteten over for residual fri fase. Et vejledningsudkast udviklet af U.S. Department of Defense og U.S. Environmental Protection Agency anbefaler, at pilotforsøg mht. stimuleret reduktiv deklorering bør undgå fri fase områder (Morse et al.

1998). Dette område undergår dog en stærk udvikling, og potentialet for oprensning af frie faser er ikke klart. I USA er to pilotforsøg undervejs for at vurdere i hvilket omfang, stimuleret biologisk nedbrydning øger opløsningen og nedbrydningen af fri fase (McMaster et al. 2002; 2003). Modelling foretaget af Seagren et al. (1994) forudsiger, at den stimulerede biologiske nedbrydning ved grænsefladen mellem den frie fase og den opløste fase øges. Efterfølgende laboratorieforsøg har påvist, at den biologiske stimulering kan øge opløsningshastigheden af den fri fase med en faktor 3-14 (Carr et al., 2000; Cope and Hughes 2001; Yang and McCarty 2000a; 2002; Adamson et al., 2003, se også afsnit 3.6.5). Tilstedeværelsen af fri fase kan forårsage komplikationer mht. fortolkningen af monitoringsdata i et pilotforsøg, herunder at bestemme nedbrydningsraten. Hovedproblemet er, at der løbende vil ske en opløsning af moderstoffet (eksempelvis PCE) til grundvandet.

Da stimuleret *in situ* reduktiv deklorering består af tilsætning af elektrondonorer og næringsstoffer til grundvand, er teknologien ikke brugbar til behandling i den umættede zone. Der er dog lavet forsøg med tilsætning af elektrondonorer på gasform, men resultaterne er endnu ikke fremlagt (Newell et al., 2001; Marnette et al., 2001), så indtil videre er stimuleret anaerob nedbrydning i den umættede zone ikke en anvendelig afværgeløsning.

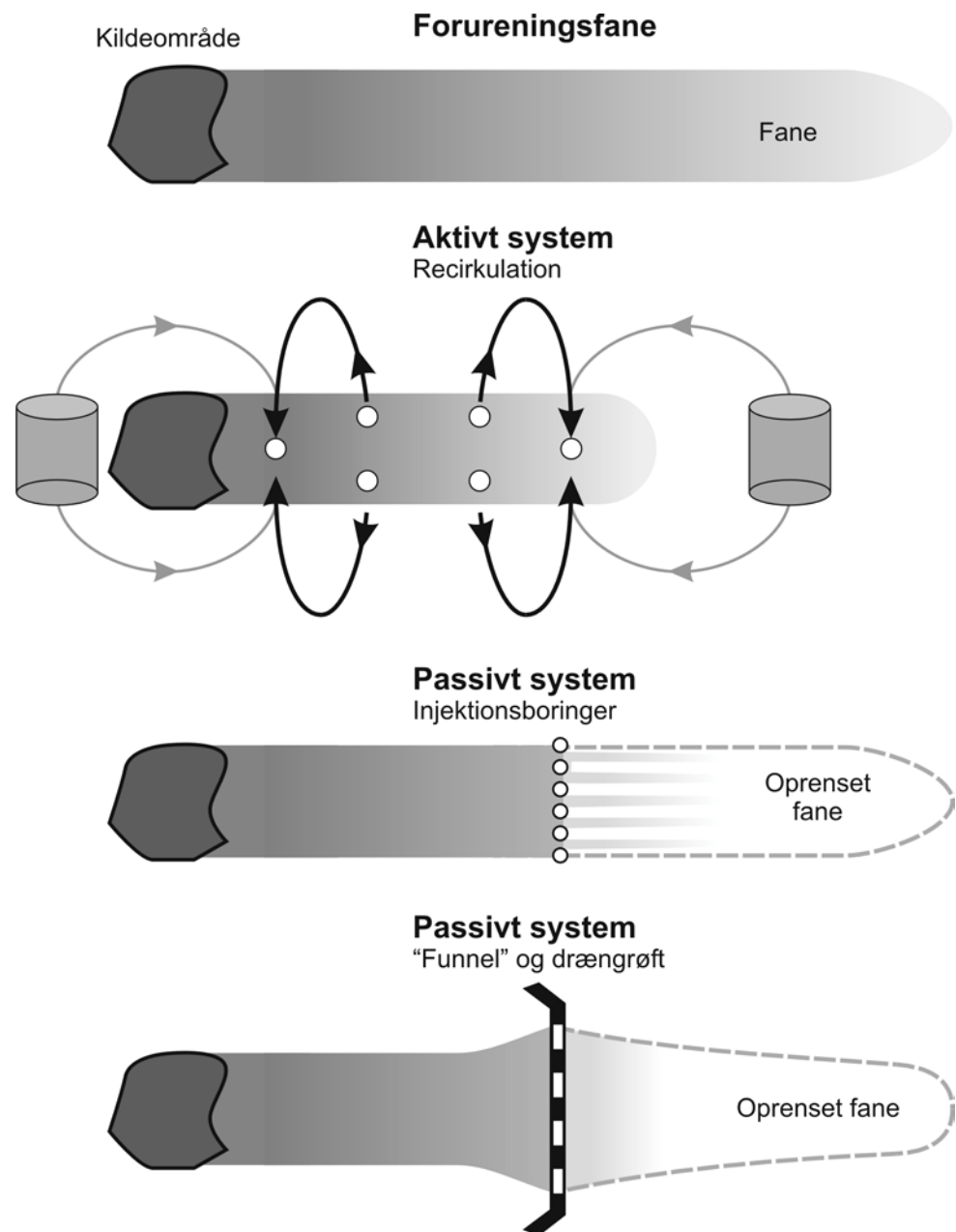
#### 4.1.3 Principper for oprensning med anaerob deklorering

For at stimuleret *in situ* reduktiv deklorering skal være vellykket, er der tre nøgleelementer i det forurenede grundvand, der skal bringes i kontakt med hinanden:

- klorerede forbindelser
- elektron donorer (samt næringsstoffer) og bakterier der er i stand til udføre fermentering af elektrondonoren, under dannelse af hydrogen
- bakterier der er i stand til at deklorere de klorerede forbindelser til uskadelige restprodukter

Nedbrydning af klorerede opløsningsmidler vil mislykkes, såfremt der mangler de fornødne bakterier og/eller hvis tilførsel af elektrondonorer er utilstrækkelig. Når de passende elektrondonorer er tilstede i den rigtige mængde, og *Dehalococcoides* kulturer er tilstede (enten naturligt eller tilsat), kan klorerede ethener blive fuldstændig nedbrudt til ethen og klorid. Effektiv tilsætning og blanding af elektrondonorer i behandlingsområdet er derfor ofte en nøgleforudsætning for vellykket *in situ* reduktiv deklorering.

Da kontakt mellem klorerede forbindelser, elektrondonorer og bakterier er en forudsætning for en oprensning spiller principper for tilførsel af donor og eller bakterier en vigtig rolle. Som det er skitseret på figur 4.1 kan der anvendes aktive eller passive injektionssystemer, som det vil blive diskuteret i det følgende afsnit, mens selve tilsætningen beskrives i afsnit 4.4.



Figur 4.1: Principskitse af aktive og passive *in situ* systemer

#### 4.1.4 Aktive og passive *in situ* systemer

##### **Aktive systemer**

Aktive systemer benytter konstant eller pulserende tilsætning af elektrondonorer (Ellis et al., 2000; Major et al., 2002; Manale et al., 2002; Lendvay et al., 2003). I forhold til passive systemer kræver aktive systemer mere materiel over jorden såsom pumper og rørføringer, injektionsudstyr og evt. automatisk kontrol- og monitoringsudstyr. Aktive systemer anvendes oftest i aflejringer med god hydraulisk ledningsevne som sand/grus aflejringer, men de er også benyttet i sprækkede aflejringer (Ellis et al., 2000; Finn et al.,

2003; Chang et al., 2003). Vandopløselige organiske stoffer som metanol, ethanol, laktat, og/eller acetat er typisk benyttet i aktive systemer.

Der anvendes forskellige aktive metoder, fx forcering af den hydrauliske gradient og recirkulation af det oppumpede grundvand horisontalt (Dybas et al., 2002) eller vertikalt (McCarty et al., 1998; Lesage et al., 2002; Manale et al., 2002). Recirkulation af grundvand har vist sig at være effektivt til distribution af tilsætningsstofferne i behandlingsområdet (Roberts et al., 1990; Ellis et al., 2000). Tilsætningsstofferne (elektron donorer og evt. næringsstoffer eller pH buffere) tilsættes det oppumpede grundvand inden reinjektionen, og den forcerede hydrauliske gradient, der er karakteristisk ved de fleste aktive systemer, sikrer en effektiv transport og spredning.

I flere tilfælde har aktive systemer til nedbrydning af klorerede opløsningsmidler været designet som bio-barrierer til afskæring og behandling af grundvandsforureningen inden passage af skel (Dybas et al., 2002; Manale et al., 2002). Ved bio-barriere opstillinger kan aktive systemer bestå af en serie af injektionsboringer placeret på tværs af forureningsfanen. Boringerne kan skiftevis fungere som injektions- eller pumpeboringer, eller det kan vælges kun at injicere tilsætningsstofferne.

I kombination med tilsætning af bakteriekulturer, der indeholder *Dehalococcoides*, har recirkulationssystemer med konstant eller pulserende tilsætning af opløste elektron donorer påvist nogle af de hurtigste nedbrydningsrater for nedbrydningen af klorerede ethener. Der er velbeskrevne aktive systemer, hvor der blev tilsat *Dehalococcoides* kulturer, hvorefter PCE, TCE, *cis*-DCE og VC blev nedbrudt til under de amerikanske drikkevandskvalitetskriterier indenfor 5-8 måneder (Ellis et al. 2000; Major et al. 2002).

Fordelen ved aktive systemer er en bedre fordeling af tilsætningsstoffer i magasinet end for passive systemer. Dette bevirker en hurtigere og mere effektiv oprensningstid. De største ulemper ved aktive systemer er, at de ikke er velegnede i lavpermeable aflejringer. Herudover er driften af afværgeforanstaltninger typisk meget vanskeligere end for passive systemer. Således må der påregnes, at der oftere er problemer med tilgroning af boringer med biofilm end for passive systemer (se afsnit 4.4.4). Det kan ligeledes være vanskeligt at reinfiltre hele den oppumpede mængde. Alternativ bortskaffelse af oppumpet grundvand kan derfor være påkrævet.

### ***Passive systemer***

Passive systemer til biologisk nedbrydning består af en batch injektion eller anbringelse af en lav-opløselig eller langsomt frigivende elektron donor i jorden i en grøft ofte kombineret med et funnel system (figur 4.1). Sådanne passive systemer kaldes ofte en bio-barriere. Barrieren er designet til at opfange og nedbryde de klorerede opløsningsmidler, der transporteres med grundvandet under normale strømningsforhold. Bio-barrieren kan bestå af eksempelvis HRC, vegetabilsk olie eller mere komplekse elektron donorer.

Passive systemer kan også udføres som et antal af behandlingspunkter (ofte på tværs af forureningsfanen) i kildeområdet eller i forureningsfanen. For at sikre en langtidsholdbar kapacitet skal elektron donoren tilsættes i en mængde, så der for en given grundvandshastighed og tidshorisont kan behandles det nødvendige antal porevolumener.

Større masseflux af forurening kan dog behandles effektivt i passive bio-barrierer (eks. vegetabilsk olie) ved at øge opholdstiden i behandlingszonen. I nogle tilfælde kan dette opnås ved at tilsætte mere elektrondonor, således at bio-barrieren bliver tykkere. Der er dog i Nordamerika desværre en tendens til, at der bliver tilsat store mængder elektrondonorer uden tilstrækkelig erkendelse af de potentielle skadelige virkninger det kan have på grundvandet (se afsnit 4.1.6 Grundvandskemi og 4.4.4 Tilklogning af borer).

Passive systemer er generelt simple og nemme at implementere. Der kræves ingen overjordiske installationer såsom rørføringer, pumper og elinstallationer. Prisen for en passiv behandling afhænger primært af enhedsomkostningerne og mængden af tilsat elektrondonor. Udgifterne til drift (herunder tilsynstid) er mindre end for aktive systemer. Driftsproblemer med tilklogning af borer er ligeledes mindre end for aktive systemer. I modsætning til aktive systemer kan passive systemer anvendes i lavpermeable aflejringer. I forhold til aktive systemer er passive systemer knap så gode til at opnå den samme kontakt mellem elektrondonor, bakterier og klorethenerne. Oprensnings-effekten er derfor typisk dårligere end for aktive systemer.

Selvom passive systemer i mange tilfælde viser lovende resultater, er der kun få detaljerede beskrivelser af metodens anvendelighed. Der er også kun i meget begrænset omfang publiceret data fra sådanne systemer i artikler med censur, så en vurdering af metodens anvendelighed er reelt baseret på ganske få lokaliteter. Typiske begrænsninger, der forhindrer en tilstrækkelig vurdering, er:

- manglende opstilling af massebalancer for forureningskomponenter (fx den molare masse, der omdannes til ethen og klorid)
- utilstrækkelige monitoringsprogrammer
- forsøg der ikke skelner mellem reduktion af forureningsmassen mht. fortynding og biologisk nedbrydning
- manglende påvisning af hydraulisk kontakt mellem behandlingsområdet og monitoringsboringer
- manglende opgørelse af grundvandsflow omkring en permeabel bio-barriere

Nogle brugere af teknikken i USA har rutinemæssigt injiceret store mængder af elektrondonorer (eks. melasse) ned i grundvandet og derefter sat deres lid til at den naturlige grundvandsstrøm kunne skabe kontakt mellem forureningskomponent og donor (fx Peeples et al., 2001; Burdick et al., 2002; Morie et al., 2002). Denne fremgangsmåde har været succesfuld på nogle lokaliteter (Maierle and Cota, 2001), men der er tre store ulemper ved metoden.

- Graden af blandingen af donor og forurening i forureningsfaner er langt mindre end ved aktive systemer med forceret gradient
- Faldet i koncentrationerne af de klorerede opløsningsmidler kan ofte skyldes fortynding frem for biologisk nedbrydning, da elektrondonorerne tilsættes i rent vand

- Tilsætning af store mængder elektrondonorer kan give anledning til dannelse af metan, sulfider, opløste metaller og et højt biologisk iltforbrug (Lee et al., 2000; Burdick et al., 2002; Yang og McCarty, 2003)

## 4.2 Lokalitetsbestemte forhold

### 4.2.1 Geologi og hydrogeologi

Ved stimuleret *in situ* reduktiv deklorering tilsættes ofte vandige opløsninger af elektrondonorer, næringsstoffer og/eller mikroorganismer (bakteriekulturer) til grundvandsmagasinet. De geologiske forhold (især strømningsforhold), har derfor stor betydning for metodens egnethed og valg af injektionsmetode. Det påvirker også valget af elektrondonorer, som bliver diskuteret i afsnit 4.4.1.

Den mest succesfulde anvendelse af aktive systemer til reduktiv deklorering har været udført i sandmagasiner (Ellis et al., 2000; Leigh et al., 2000; Major et al., 2002; Lendvay et al., 2003). Det skyldes formentlig, at der sker en effektiv opblanding og spredning af de injicerede stoffer i grundvandsmagasinet. I overensstemmelse hermed udføres aktive afværgeforanstaltninger med biologisk nedbrydning bedst ved magasiner med en hydraulisk ledningsevne på over  $5 \times 10^{-6}$  m/s, svarende til siltede jordlag (Thomas and Ward, 1989; Morse et al., 1998). Meget høje ledningsevner ( $> 10^{-3}$  m/s) kan medføre høje oppumpnings- og injektionsrater med store omkostninger til følge.

Pilotforsøg i sprækkede formationer bliver mere almindelig (e.g., Chang et al. 2002; 2003; Finn et al. 2003), men der er kun få erfaringer med fuldskalaoprensning i sprækkede formationer (eksempelvis opsprækket kalk og klippe).

Da forurening med klorerede opløsningsmidler i Danmark ofte er knyttet til lavpermeable aflejringer (eksempelvis moræneler og silt), er det vigtigt at få belyst erfaringer med metoden i lavpermeable aflejringer. I litteraturgennemgangen er der dog kun få sager, hvor der er sket oprensning i lavpermeable aflejringer. Udvalgte sager er vist i tabel 4.1.

Den store udfordring ved anvendelse af metoden i lerjord er at få fordelt elektrondonoren i hele indsatsområdet. Injektionen af elektrondonor er derfor essentiel for at få succes. Injektion gennem borer der trykkes/rammes ned (fx direct-push med Geoprobe) er den mest anvendte metode i lavpermeable aflejringer. Injektionspunkterne skal placeres relativt tæt – typisk indenfor en afstand på 1,5 – 2 m (Zahiraleslamzadeh et al., 2001; Boyle et al., 2000; Railsback et al., 2002).

Erfaringerne i lavpermeable aflejringer indikerer, at det er muligt at få fordelt elektrondonoren i en stor del af injektionsområdet, og få skabt stærkt reducerede forhold. Erfaringerne fra oprensningerne viser ligeledes, at det er muligt at få den reduktive deklorering til at forløbe. Der er dog ingen af projekterne, hvor der er sket en fuldstændig oprensning. Det må forventes, at der efterlades ubehandlede områder, og at tidshorisonten er flere år. Det må endvidere forventes, at der skal ske periodevis injektion af elektrondonor, idet donoren sandsynligvis vil blive opbrugt inden for 1-2 år. I en af sagerne er der anvendt hydraulisk frakturering for at få en bedre fordeling af elektrondonoren (Martin et al., 2002). Den hydrauliske ledningsevne blev



forøget med en faktor 10 ved fraktureringen, og det lykkedes at få fordelt elektrondonoren i de dannede sprækker.

Der er ikke tilsat bakteriekultur (bioaugmentation) i sagerne i tabel 4.1. Resultaterne fra Murray et al. (2001), Skoff et al. (2002) og Martin et al. (2002) viser, at der sker ophobning af *cis*-DCE, hvilket indikerer, at der er behov for bioaugmentation (se afsnit 4.5.2). Derimod sker der en fuldstændig reaktiv deklorering i sagerne beskrevet af Boyle et al. (2000) og Zahiraeslamzadeh et al. (2001).

Anvendelse af reaktive vægge eller biobarrierer i lavpermeable aflejringer er beskrevet i Fischer et al. (2001), Haas et al. (2000), Aziz et al. (2001) og Murray et al. (2001). Ulempen ved denne metode er, at den typisk kun er en afskæringsløsning, hvorved driftstiden ofte bliver meget lang. Desuden tages der ikke hånd om den vertikale forureningstransport mod dybereliggende magasiner, som netop i lavpermeable aflejringer kan være kritisk.

Tabel 4.1 Udvalgte oprensninger i lavpermeable afljæringer

Lokalitet	Koncentration	Skala	Geologi og hydrogeologi	Elektron donor	Metode	Bemærkning	Reference
Industri, USA	TCE: < 26 mg/l	Fuld	Leret silt	HRC	Geoprobe, direct-push, passiv. 21 injektionspunkter med en afstand på 1,5 m og ca. 16 kg HRC i hver punkt.	15 måneder efter injektion var TCE indholdet faldet 64 %. Ophobning af DCE (18 mg/l) ved slut af forsøg (15 måneder efter injektion). Dannelse af VC og ethen, hvilket indikerer fuldkommen reduktiv deklorering.	Boyle et al., 2000
Renseri, USA	PCE: <0,7 mg/l	Fuld	Silt, ler, med sandslirer.  $k = 1,9 \times 10^{-5}$ til $6,3 \times 10^{-7}$ m/s	Jern-0 og HRC	Reaktiv væg, passiv. 140 kg HRC tilsat efterfølgende med direct-push teknologi i 7 punkter.	PCE nedbrudt med op til 95 % på 1 år efter tilsætning af HRC. Ingen betydelige mængder af nedbrydningsprodukter dannet hvilket indikerer, at der ikke er sket reduktiv deklorering.	Fischer et al., 2001
Militær, USA	TCE: 1,9 - 2,1 mg/l	Pilot og fuld	silt og ler	Findelt trækompost	Biobarriere, passiv (33 m bred x 0,3 m bred x 7,5 m dyb).	Den reaktive væg medfører anaerobe forhold. TCE fjernelse på op til 89%. Ethen dannes. Cost-effektiv metode. Grundvandshastighed ca. 30 m/år hvilket er relativt høj for lavpermeable afljæringer.	Haas et al., 2000, Aziz et al., 2001
Industri, USA	TCE, <i>cis</i> -DCE, VC: samlet indhold 1 mg/l.	Pilot	Siltet ler  $k = 1,2 \times 10^{-7}$ m/s	Kitin	Passiv, Elektron donor tilsat i forbindelse med hydraulisk frakturering.	Fraktureringen øgede den hydrauliske ledningsevne med en faktor ca. 10. Pilotforsøget indikerede at elektrondonor kan injiceres til lerjord med frakturering. VFA fordelt i sprækker og metanogene forhold blev observeret. Der skete en vis reduktiv deklorering, men stadig relative høje indhold tilbage af <i>cis</i> -DCE.	Martin et al., 2002
USA	PCE: <6,4 mg/l	Pilot	Silt, ler  $k = 1,7 \times 10^{-5}$	HRC	Biobarriere med 2 rækker. 1,6 m mellem injektionspunkter. 15 injektionspunkter med HRC ved direct-push - 3-7 m u.t.	120 dages forsøgsperiode. Nedbrydningen af PCE standsede ved <i>cis</i> -DCE. <i>cis</i> -DCE indhold steg fra 0,6 mg/l til 15 mg/l efter 4 måneder. Høje indhold af VFA blev dannet i biobarrieren og lige nedstrøms herfor.	Murray et al., 2001
Renseri, USA	PCE: <4,5 mg/ TCE: 1 mg/ <i>cis</i> -DCE: 7,3 mg/l	Fuld	Ler	HRC	3171 kg HRC blev injiceret med top-down injektionsmetode under stort tryk. I alt 45 boringer på et areal på 283 m <sup>2</sup> med injektion fra 2,1 til 6,7 m u.t.	Redoxpotentialer er faldet efter injektionen hvilket indikerer udbredelse af HRC. Fald i forureningsindhold, men ingen tegn på reduktiv deklorering (ingen stigning i <i>cis</i> -DCE, VC og ethen).	Railsback et al., 2002
Industri, USA	PCE: 0,5-22,9 mg/l	Pilot + Fuld	siltet sand, silt  $k = 4 \times 10^{-6}$ til $1,2 \times 10^{-7}$ m/s	HRC	Ca. 5000 kg HRC injiceret med direct push med Geoprobe i 55 punkter, passiv.	Anaerobe forhold blev dannet i det meste af injektionsområdet og vedblev 15 måneder efter injektionen. 80 % massefjernelse af PCE. Ophobning af <i>cis</i> -DCE efter 15 måneder	Skoff et al., 2002
Industri, USA	TCE: 5 mg/l	Fuld	Siltet ler	HRC	Ca. 5500 kg HRC blev injiceret i 103 direct-push punkter i et 1,6 m x 3,3 m og et 1,6 x 1,6 m net. Top-down, injektionsmetode fra ca. 3 – 9 m u.t.	De fleste steder blev der observeret lavt redoxpotentialer og højt brint indhold i injektionsområdet, hvilket indikerer rimelig fordeling af elektrondonor. Efter 12 måneder sker der reduktiv deklorering til ethen. Dog akkumulering af VC (2000 ug/l) og <i>cis</i> -DCE (100 ug/l).	Zahrales lamzadeh et al., 2001.

#### 4.2.2 Grundvandskemi

I litteraturgennemgangen har metoden fundet anvendelse både i anaerobe og aerobe magasiner. Markant ophobning af nedbrydningsprodukterne *cis*-DCE, VC og ethen sammen med stærkt reducerede forhold (Morse et al. 1998) er gode indikationer på, at grundvandskemien på lokaliteten er gunstig for stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. På lokaliteter med aerobe forhold, hvor koncentrationen af nedbrydningsprodukter er ubetydelig, kan stimuleret *in situ* anaerob deklorering stadig være en velegnet metode (Cox et al., 2002; Major et al., 2002). Dog vil tilvænningsperioden, før den anaerobe deklorering er effektiv, være længere end på lokaliteter med allerede anaerobe forhold. Erfaringerne fra Jægersborg Allé, hvor en aerob/nitrat reducerende akvifer fik tilført HRC viste ingen tegn på anaerob deklorering på trods af, at de rette redoxforhold formentlig i en længere periode har været gældende (Miljøstyrelsen, 2003a). Det kan dog ikke afgøres, om årsagen var mikrobiel eller geokemisk. Umiddelbart må det forventes, at bioaugmentation er mere nødvendig i aerobe magasiner, da sandsynligheden for, at *Dehalococcoides* vil være tilstede er mindre. Erfaringsgrundlaget er dog på nuværende tidspunkt spinkelt, men det er vist, at *Dehalococcoides* ikke så hyppigt optræder i aerobe magasiner som i anaerobe magasiner (Durant., 2003; Hendrickson et al., 2002; Major et al., 2002).

Grundvand med høje koncentrationer af giftige forbindelser (fx cyanid, cadmium, kviksølv osv.), atypiske pH-værdier (<5 eller >9), høj salinitet (eks. brakvand) er ikke gunstigt for reduktiv deklorering. I grundvand med høj ionstyrke kan tilsætningen af mikroorganismer være problematisk, da bakterierne i højere grad fastholdes til akviferet (hvorved mobiliteten reduceres) ved stigende ionstyrke (Martin et al., 1992; Rijnaarts et al., 1996).

Konkurrerende elektronacceptorer er væsentlig for anaerob deklorering, da de kan forhindre processen i at forløbe, er dimensionsgivende for mængden af donor og kan resultere i afledte geokemiske effekter. De væsentligste elektronacceptorer er ilt, nitrat, jern(III), mangan(IV), sulfat og kuldioxid (se afsnit 2.2). Under feltforhold er det væsentligt at skelne mellem sedimentbundne (jern, mangan) og opløste elektronacceptorer. De opløste elektronacceptorer er fornybare og vil afhængig af design til stadighed føres ind i det forurenede område, hvor dekloreringen skal stimuleres. De sedimentbundne elektronacceptorer er tilstede i det forurenede område, og vil gradvis blive forbrugt. Men da de består af naturligt forekommende jern- og manganforbindelser vil tilgængeligheden være sværere at forudsige og ændres over tid (de lettest tilgængelige jernhydroxider reduceres først). Detaljer omkring disse forhold er gennemgået detaljeret i Christensen et al. (2000), og dimensionering af donortilsætning er diskuteret i afsnit 3.7.2 og 4.4.3.

Ved at tilsætte en donor til det forurenede område initieres reduktion af elektronacceptorerne, og der dannes en række sideprodukter. Begge dele kan have negative effekter på effektiviteten af den anaerobe deklorering (se afsnit 3.4) og sideprodukter kan i sig selv give anledning til et problem. Det drejer sig især om dannelsen af opløst jern og mangan, sulfid og metan. På mange lokaliteter er jern (III) og sulfat de primære elektronacceptorer, som vil forbruge de tilsatte elektronacceptorer (Schumacher et al., 2000; Leigh et al., 2000; Evans and Koenigsberg, 2001; Findlay et al., 2002). Dette er vist i tabel 4.2 ved en beregning af den totale oxidationskapacitet og det teoretiske elektrondonorforbrug på to danske lokaliteter med laktat som eksempel. Vejen lokaliteten er aerob, og der er et stort indhold af oxiderede jernforbindelser på

sedimentet. På Jægersborg Allé er der svagt nitratreducerende forhold, og det naturlige indhold af oxiderede jernforbindelser på sedimentet er betydeligt lavere. På trods af det kan der teoretisk forventes et betydeligt forbrug af laktat til jernreduktion, hvilket også blev observeret på lokaliteten (Miljøstyrelsen, 2003a). Der er også potentielt et stort forbrug af laktat til sulfatreduktion på Jægersborg Allé. Laktatforbruget til reduktion af nitrat er lille, og forbruget til reduktion af ilt er ubetydeligt.

Tabel 4.2. Beregning af oxidationskapacitet og teoretisk laktatforbrug ( $C_3H_6O_3$ ) for at reducere opløste og sedimentbundne elektronacceptorer pr.  $m^3$  akvifermateriale for to danske lokaliteter. Der er ikke taget højde for oxidationskapacitet knyttet til manganoxider, organisk kulstof i vandfasen eller på sedimentet. Der er antaget en porøsitet på 0,33 og en rumvægt på  $1780 \text{ kg/m}^3$ .

Elektron-acceptor	Koncentration	Vejena		Jægersborg Alléb		
		Oxidationskapacitet <sup>c</sup> eq/ $m^3$	Laktatforbrug <sup>d</sup> g/ $m^3$	Koncentration	Oxidationskapacitet eq/ $m^3$	Laktatforbrug <sup>c</sup> g/ $m^3$
$O_2$	10 mg/L	0,4	3,5	1 mg/L	0,04	0,3
$NO_3^-$	66 mg/L	1,8	3,0	75 mg/L	2,0	15
Fe(III)	6 g/kg	195	1385	0,5 g/kg	16,3	115
$SO_4^{2-}$	40 mg/L	1,1	8,3	200 mg/L	5,5	41,5
<b>Sum</b>		<b>198</b>	<b>1400</b>		<b>24</b>	<b>172</b>

a: Data for Vejen er baseret på Christensen et al. (2000); b: Data fra Jægersborg Allé er baseret på Miljøstyrelsen (2003).

c: Oxidationskapaciteten er baseret på definitionen i Christensen (2000).

d: Reaktionsligninger for laktatforbrug er baseret på Miljøstyrelsen (2003).

Opløst jern er typisk tilstede som jern (II) ved normale pH-forhold, og vil dannes i signifikante koncentrationer i en overgangsfase fra aerobe/nitratreducerende til stærkt anaerobe forhold (sulfatreducerende, metandannende). Høje opløste jern(II) koncentrationer er rapporteret på talrige lokaliteter. På Jægersborg Allé blev der observeret koncentrationer på op til 80 mg Fe/l og Evans og Koenigsberg (2001) rapporterer koncentrationer på over 250 mg Fe/l for amerikanske lokaliteter. Sådanne høje koncentrationer kan give anledning til efterfølgende klogning, hvis der sker udfældning med ilt (se afsnit 4.4.4). I mange tilfælde vil de aktuelle koncentrationer være lavere, da der vil ske udfældning med karbonat og sulfid.

Betydningen af jernreduktion for anaerob deklorering er dårligt belyst (afsnit 3.4), men der pågår en diskussion af om aktiv jernreduktion kan forhindre, at der sker anaerob deklorering. Evans og Koenigsberg (2001) ser en sammenhæng mellem manglende deklorering til VC fra *cis*-DCE på lokaliteter, hvor der stadig foregår jernreduktion. Miljøstyrelsen (2003) rapporterer, at der ses en betydelig jernreduktion, samtidig med, at der ikke sker anaerob deklorering på Jægersborg Allé. Samtidig observeres der tilsyneladende samtidig jern- og sulfatreduktion, hvilket komplicerer situationen yderligere. Det sidste er observeret mange steder, og sideløbende redoxprocesser er under feltforhold veldokumenteret (Christensen et al., 2000). Uheldigvis er der i litteraturen få felldata om jernreduktionens effekt på den anaerobe deklorering, og problemstillingen må anses for at være mangelfuldt belyst.

Sulfat er på molbasis en vigtig elektronacceptor i mange akviferer. Samspillet mellem reduktiv deklorering og sulfatreduktion er kompliceret (afsnit 3.4), og høje sulfatkoncentrationer er hyppigt nævnt som et problem for en effektiv dekloreringsproces (Schumacher et al., 2000). En anden problemstilling er knyttet til dannelsen af sulfid fra reduktion af sulfat. Sulfid vil typisk udfælde med reducerede jernforbindelse som monosulfider eller pyrit. Disse udfældninger vil potentielt kunne reoxideres senere og give anledning til forsurening og dannelse af bl.a. sulfat.

Metandannelse er en meget vigtig proces i samspillet med anaerob deklorering, som diskuteret i afsnit 3.4. Generelt viser laboratorieundersøgelser, at det ikke er ønskeligt at overstimulere metandannelsen. Under feltforhold har stimulering af metandannende forhold formentlig også en negativ effekt, især måske i relation til at elektrodonor spildes til processen. Der er i talrige tilfælde rapporteret om metandannelse i høje koncentrationer (10-30 mg/l). En afledt effekt af disse koncentrationer er dannelse af gasbobler i grundvandszone, som kan reducere den hydrauliske ledningsevne. Desuden har det være diskuteret, om metandannelse skabte en risiko for gasekspllosioner. Afdampning af metan til den umættede zone og efterfølgende ophobning i huse og kældre kan potentielt resultere i volumenkoncentrationer over det eksplosive niveau (5%). Der er ikke rapporteret konkrete eksempler på eksplosioner foranlediget af donortilsætning.

#### 4.2.3 Fysiske forhold på lokaliteten

Implementering af stimuleret reduktiv deklorering som afværgeløsning kræver tilstrækkelig plads på lokaliteten for at tillade installation af injektions- og monitoringsboringer og opstilling og betjening af udstyr. Valget af tilsætningsmetode kan delvist også dikteres af den tilgængelige plads. Bio-barrierer kan være den eneste løsning på lokaliteter med begrænset plads.

For biologisk nedbrydning af klorerede opløsningsmidler kan visse måder til implementering af teknologien øge dannelsen af høje koncentrationer af metan. Specielt metoder, der benytter injektion af store mængder let bionedbrydeligt materiale (fx melasse), har i visse tilfælde vist sig at danne høje indhold af metan i grundvandet (Burdick et al., 2002; Kean et al., 2002). På lokaliteter med høj grundvandsstand og i nærhed af beboelses- eller industribebyggelse, bør en vurdering af metodens anvendelse derfor også inkludere risikoen for ophobningen af eksplosive metangasser i den umættede zone.

#### 4.3 Dimensioneringsgrundlag

Dimensioneringsgrundlaget for *in situ* stimuleret biologisk nedbrydning kan ifølge (Lee et al., 1988; Morse et al., 1998) bestå af følgende faseopdeling:

- Lokalitetsbeskrivelse og -feltundersøgelser
- Gennemførelse af laboratorieforsøg (treatability studies) til vurdering af relevante tilsætningsstoffer til grundvandet
- Feltskala dimensioneringsforsøg (pilotprojekt)
- Fuldskala implementering

#### 4.3.1 Lokalitetsbeskrivelse og -feltundersøgelser

Formålet med en beskrivelse af lokaliteten er at opnå en grundig forståelse af forureningssituationen (type og udbredelse), hydrogeologien og geokemi. Gennem denne process vurderes det, om stimuleret biologisk nedbrydning er mulig, og i så fald hvilken metode, der kan benyttes. I mange tilfælde foreligger der omkring lokaliteten omfattende data, der bør benyttes til udviklingen af en konceptuel model til vurdering af forureningsspredning og hydrogeologi. I tilfælde af sparsomme data om lokaliteten, er det nødvendigt at udføre supplerende undersøgelser. For de fleste lokaliteter, bør en grundig beskrivelse fokusere på at kvantificere de nødvendige design parametre for stimuleret biologisk nedbrydning netop i de områder, hvor stimuleringen skal foregå.

I appendiks C er opsummeret den information, som er nødvendig for at udvikle et koncept, der er tilstrækkeligt til at bestemme metodens anvendelse (Morse et al. 1998).

#### 4.3.2 Laboratorieforsøg (treatability tests)

Laboratorieforsøg (treatabilityforsøg) bliver anvendt i Nordamerika til at vurdere om *in situ* reduktiv deklorerer er en anvendelig afværgeløsning for en forurening med klorerede opløsningsmidler. Udover at kunne identificere anvendelige elektrondonorer og behovet for bioaugmentation, kan laboratorieforsøg bruges til at vurdere dosering af elektrondonorer, og måden elektrondonoren skal leveres på (passivt eller aktivt). Gennem de indledende forsøg kan ikke egnede fremgangsmåder identificeres, hvilket kan mindske risikoen for ringe udførelse og spildte udgifter ved det efterfølgende feltarbejde. Forhold vedr. treatability test er beskrevet i afsnit 3.7.

#### 4.3.3 Dimensioneringsforsøg i felten

Når metoden er påvist effektiv ved laboratorieforsøg, er det næste skridt at vurdere anvendelsen af teknologien under feltforhold. Den følgende gennemgang følger en vejledning udarbejdet af United States Department of Defense and Environmental Protection Agencies (Morse et al. 1998).

Der benyttes mange fremgangsmåder ved afprøvning i felten, men de mest almindelige er:

- Push-pull test
- *In situ* mikrokosmos
- Pilotforsøg.

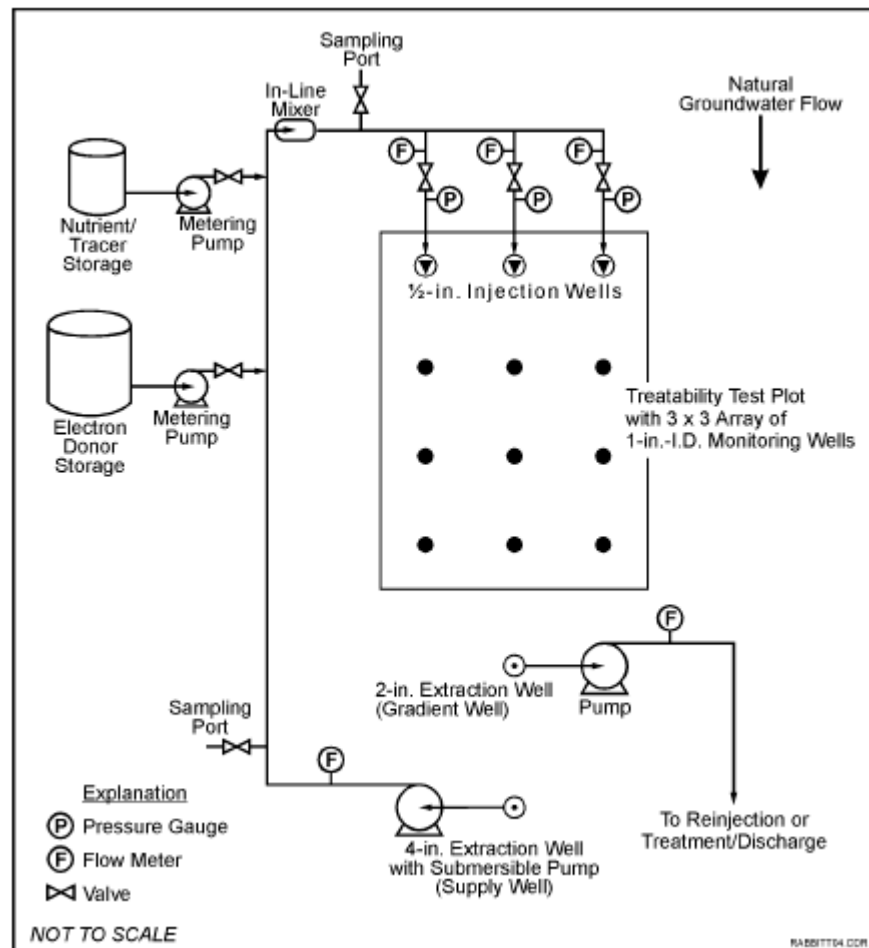
Push-pull test og *in situ* mikrokosmos er småskala afprøvninger, der nogle gange er brugt i stedet for laboratorietests. Pilotforsøg er den bedste indgangsvinkel til en fremtidig fuldskala implementering og er den mest benyttede metode i felten. *In situ* mikrokosmos og push-pull tests, der begge er statiske systemer, kan ikke erstatte pilotforsøg til afprøvning af aktive systemer. I appendiks D er der en nærmere beskrivelse af push-pull test og *in situ* mikrokosmos forsøg.

### **Pilotforsøg**

I vejledningen fra Morse et al. (1998) er der en detaljeret beskrivelse af dimensioneringen af pilotforsøg herunder design, etablering og felttest. Formålet med pilotforsøg er at undersøge tilførsel og oprensningseffektivitet af de tilsatte elektrondonorer mm. i feltskala. Aktive systemer med forceret gradient og recirkulering er de mest anvendte pilotforsøg i artikler med censur (Lee et al. 1988; Roberts et al., 1990; McCarty et al., 1998; Morse et al., 1998; Ellis et al., 2000; Dybas et al., 2002; Major et al., 2002; Lendvay et al., 2003). Med denne type af testmetode bliver grundvand oppumpet fra det forurenede magasin, tilsat elektrondonorer (og evt. bakteriekulturer, næringsstoffer og pH buffere) og rejnificeret ind i behandlingsområdet.

Konstant eller pulserende tilførsel af elektrondonorer er med til at udvikle en biologisk aktiv zone. Indsamling af monitoringsdata fra flere punkter mellem injektions- og oppumpningsboringer tillader en vurdering af systemets virkningsgrad. Ved recirkulering kan der opnås den bedst mulige chance for opstilling af en massebalance på forureningskomponenterne. Massebalancen kan påvise, at forureningsmassefjernelsen er sket på grund af den stimulerede biologiske nedbrydning og ikke på grund af fortynding. Benyttelse af en tracer både før og samtidig med injektionen af tilsætningsstofferne er vigtig for at bestemme den hydrauliske opholdstid og opstilling af massebalancer.

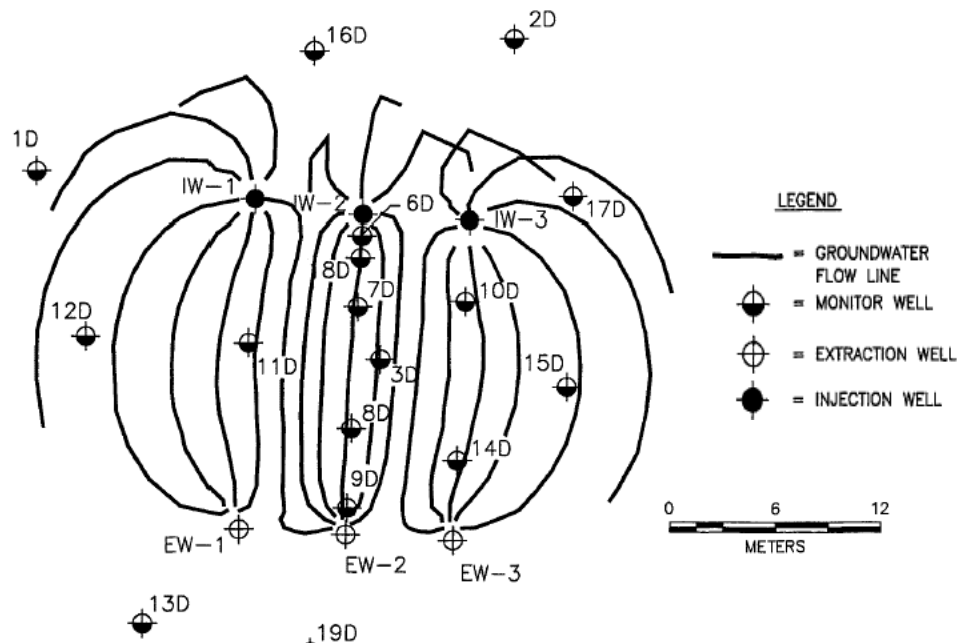
Morse et al. (1998) anbefaler, at pilotprojekter for anaerob deklorering af klorerede opløsningsmidler benytter tre injektionsboringer, to pumpeboringer og en serie monitoringsboringer placeret mellem injektions- og pumpeboringer (se figur 4.2). Pilotprojekter, der er udført i overensstemmelse med vejledningen, varer normalt 6 måneder. Forslagene i Morse et al. (1998) blev skrevet før udviklingen af de kommercielle *Dehalococcoides* kulturer og tager derfor ikke bioaugmentation i betragtning. Figur 4.3 viser eksempel på pilotforsøg på Dover AFB (Ellis et al., 2000). Denne sag er beskrevet mere detaljeret i appendiks B.



Figur 4.2 Monitoringsnetværk for pilotprojekter (Morse et al. 1998).

Omkostningerne ved pilotforsøget er en nøgelfaktor, der påvirker beslutningen om, hvorvidt der skal fortsættes fra pilotforsøg til fuldskala implementering. Omkostningerne ved at implementere teknologien vil variere fra sted til sted, hvorfor en cost-benefit-analyse bør udføres for hver enkelt lokalitet. På steder, hvor et eksisterende pump-and-treat system er i drift, vil implementering af stimuleret reduktiv deklorering kræve mindre investeringer, da de allerede eksisterende boringer, pumper og rør kan anvendes. Fuldskala implementering af aktive systemer kan være for omkostningstunge på lokaliteter med store forureningsfaner. Passive systemer (med naturlige gradienter), der afskærer forureningsfanen, kan være mere fordelagtige for fuldskala implementering på disse lokaliteter. Selv om fuldskala-løsningen i sidste ende bliver designet som semi-passiv eller passiv biologisk nedbrydning, vil dette ikke nødvendigvis udelukke brugen af en aktiv biologisk nedbrydning i pilotforsøget. Et aktivt system i et pilotforsøg tillader massebalanceberegninger på forureningen og restprodukterne på en måde, som typisk ikke er muligt ved et passivt system. Desuden er den tid, som det tager at påvise en effektiv behandling typisk meget kortere med et aktivt system.





Figur 4.3 Eksempel på boringsplacering ved pilotforsøg. (Elliis et al., 2000)

#### 4.3.4 Fuldskala implementering

Et veludført pilotforsøg giver et mål for den biologiske nedbrydning, behovet for elektrondonor og bakterietilsætning, samt sekundære påvirkninger af grundvand på feltskala-niveau. Denne information er afgørende for udviklingen af et effektivt fuldskalasystem og for at reducere usikkerheden omkring vurderede udgifter og driftstid. Et fuldskalasystem bør, så vidt det overhovedet er muligt, bruge de oplysninger, der er fremkommet under pilotforsøget. Samtidig skal fuldskala-systemet kunne klare eventuelle nye forhold, som måske ikke har været tilstede i området, hvor pilotforsøget blev udført, herunder forskellige hydrogeologiske forhold. Hydrogeologisk heterogenitet er en af de største udfordringer for overgangen fra pilotforsøg til fuldskalaimplementering. På lokaliteter, hvor heterogeniteten er markant, kan et enkelt pilotforsøg være utilstrækkeligt til at fastslå, hvilken metode der er anvendelig. På lokaliteter, hvor pump-and-treat anvendes tæt på behandlingsområdet, bør det overvejes at benytte den eksisterende forcerede gradient til at sprede elektrondonorerne.

Oftentimes pilot tests cannot replicate the conditions that will arise as a result of long-term operation. Therefore, the design and plans for full-scale implementation of stimulated anaerobic biological degradation should take into account potential adverse processes, which over a longer period can become more significant. This involves the closure of injection wells due to biomass growth, the closure of treatment areas due to the accumulation of methane and problems with, for example, high concentrations of dissolved metals in the groundwater. These problems can only be avoided by the selection of appropriate electron donors and suitable concentrations. Moreover, the need for electron donors can change over time and space, so that a six-month pilot project can be insufficient to determine the lifetime of electron donors in the groundwater reservoir (especially for passive systems using slowly releasing donors). Full-scale systems should take into account the expected lifetime of slowly releasing donors by taking into account the donor requirement for competing redox processes.

#### 4.4 Elektrondonorer

##### 4.4.1 Valg af elektrondonor

Tabel 4.3 og 4.4 viser udvalgte elektrondonorer, som har været brugt ved feltoprensninger. Appendiks A.2 viser hvilke elektrondonorer, der har været anvendt ved de enkelte feltforsøg. Elektrondonorer, som har været anvendt i laboratorieforsøg, fremgår af afsnit 3.2.

Stoffer, der normalt benyttes som elektrondonorer, er laktatbaserede polymere (HRC), oliebaserede langsomt frigivende forbindelser, opløselige forbindelser såsom sukkerstoffer (melasse), fødevarebaserede syrer (acetat eller laktat), alkoholer (metanol eller ethanol) og andre naturligt forekomne materialer (kitin eller savsmuld af bark). Under anaerobe forhold er alle disse stoffer genstand for fermentering, hvorved der dannes hydrogen ( $H_2$ ), se kapitel 2 og 3.

Tabel 4.3 Oversigt over elektrondonorer, som har været brugt ved feltoprensninger.

Donor	Langsom frigivende	Opløst, let omsætteligt	Hyppighed af anvendelse ved feltoprensning
Acetat		X	Moderat
Træ/bark kompost	X		Lav
Kitin	X		Lav
Emulgeret sojabønneolie	X		Moderat
Ethanol		X	Moderat
Format		X	Lav
Hydrogen gas		X	Moderat
HRC (polylaktatester)	X		Høj
Laktat		X	Høj
Metanol		X	Moderat
Melasse		X	Moderat
Sojabønneolie/-vegetabilsk olie/oleat	X		Moderat
Vitamin B <sub>12</sub> /Titanium <sup>III</sup> citrat		X	Lav

De hydrogeologiske forhold på en lokalitet bestemmer alene ikke muligheden for stimuleret anaerob reduktiv deklorering, men også typen af elektrondonor og måden, som den bliver tilsat på. Sand- og grusmagasiner og sprækkede formationer som kalkmagasiner er ofte velegnede til aktiv tilsætning af elektrondonorer såsom natriumlaktat, metanol, format, etanol og acetat (Morse et al., 1998; Litherland et al., 1999; Fam et al., 2000; Leigh et al., 2000; Langenhoff et al., 2001; Henseen et al., 2001; Major et al., 2001; Findlay et al., 2002; Cox et al., 2002; McMaster et al., 2003; Chang et al., 2003; Finn et al., 2003; Lendvay et al., 2003). I lavpermeable aflejringer anvendes typisk langsomtfrigivende elektrondonorer som HRC, vegetabilsk olie eller kitin.

HRC (polylaktatester) er den mest anvendte donor i verden. HRC er en langsomt frigivende donor som anvendes i passive systemer i både lav- og højpermeable aflejringer. HRC blev anvendt på pilotprojektet på Jægersborg

Alle i København Amt. Laktat er den mest anvendte vandopløselige donor, som er anvendt i Nordamerika, og er karakteriseret ved en effektiv omdannelse til hydrogen. I flere projekter, hvor der tilsættes vandopløselige elektrondonor, er der anvendt en blanding af forskellige elektrondonorer (Hennsen et al., 2001; Major et al., 2002; Fam et al., 2000). Acetat er ikke velegnet som eneste donor, da acetat ikke fermenterer (acetat er et fermenteringsprodukt).

Melasse er et sukkerstof, som ikke er den mest effektive kilde til hydrogenfrigivelse ved fermenteringen. Melasse skal derfor tilsættes i relativt store mængder og har tendens til at danne mere metan end andre donorer. Melasse anvendes dog en del i Nordamerika med rimelige resultater (Peeples et al., 2001; Maierle et al., 2001; US EPA., 2000c).

Findelt bark/træ kan indbygges i eksempelvis biobarrierer og er et meget billigt alternativt. Ud fra feltforsøgene beskrevet af Haas et al. (2000) og Aziz et al. (2001) ser det ud til, at denne donor stimulerer den reductive deklorering.

Det er vanskeligt på forhånd at udpege elektrondonorer som er bedre end andre. Ved udvælgelse af donorer kan følgende forhold indgå:

- Afprøvning af forskellige donorer ved laboratorieforsøg
- Udvalgelse ud fra hydrogeologiske forhold (høj eller lavpermeable aflejringer og aktivt eller passivt system)
- Adgangsforhold til lokaliteten, herunder om der anvendes aktivt eller passivt system
- Størrelse af indsatsområde (pris for donor har stor betydning)
- Hvilke donorer kan accepteres af myndighederne?
- Økonomi

Tabel 4.4 Oversigt over elektrondonorer

Teknologi/ elektron- donor	Anvendelse i aktive systemer	Anvendelse i passive systemer	Påvist vellykket med Bioaugmentation	Bioaugmentation kulturer benyttet	Typisk anvendelse	Fordele	Begrænsninger og ulemper	Referencer
Acetat	●		●	KB-1	Vandig opløsning, kontinuert eller pulserende injektion. Recirkulation almindeligt.	Fødevarer tilsætningsstof, let bionedbrydeligt. Let anvendeligt i grundvandsmagasiner.	Omdannes ikke så effektivt til hydrogen som andre organiske elektrondonorer. Ikke egnet til passive systemer (kræver kontinuerlig eller pulserende tilsætning).	Fam et al. 2000; Major et al. 2001; 2002
Bark/tørv (wood mulch)		●			Permeabel reaktiv barriere (Biowall)	Langvarig, langsomt frigivende kilde af elektrondonor. Bio-barrieren sorberer forureningerne, samt udgør potentiel elektrondonor til biologisk nedbrydning. Naturligt materiale, let anvendelig i biobarrierer.	Frembrydende teknologi. Successfuld udførelse i feltet er endnu ikke påvist. Feltforsøg har ikke effektivt påvist massebalancer gennem barrieren, eller sammenhæng mellem monitoringspunkter. Potentiale for at barrieren hindrer grundvandsflow, specielt over tid, hvilket vil reducere virkningsgraden.	Haas et al. 2000; Aziz et al. 2001
Kitin		●			Permeabel reaktiv barriere (Biowall)	Langvarig, langsomt frigivende kilde af elektrondonor og nitrogen. Naturligt materiale, let anvendeligt i grundvandsmagasiner.	Frembrydende teknologi. Vellykket udførelse (bestemt ved fuldstændig afstemning af massebalance for nedbrydning til ethen) er ikke påvist i feltet.	Martin et al. 2002
Emulgeret sojabønneolie		●		KB-1	Permeabel reaktiv barriere (Biowall) eller i et net af injektionspunkter	Langvarig, langsomt frigivende kilde af elektrondonor. Fødevarer tilsætningsmiddel. Den emulgerende natur tillader større influensradius i injektionspunkterne.	Frembrydende teknologi. Kan sorbere nogle kloroethener for derved at forsinke deres nedbrydning. Ved tilsætning i stort overskud, er der et potentiale for påvirkning af grundvandskvaliteten med øget indhold af opløste organiske forbindelser og dermed frigivelse af metaller. Kan også frembringe forhøjede værdier af sulfid og methan.	Beckwith et al. 2002; Borden et al. 2002
Ethanol	●		●	KB-1	Vandig opløsning, kontinuert eller pulserende injektion. Recirkulation almindeligt.	Fødevarer tilsætningsmiddel, let bionedbrydeligt. Ved kombination med tilsætning af <i>Dehalococcoides</i> kulturer og recirkulation, er fuldstændig nedbrydning til ethen påvist.	Ikke egnet til passive systemer (kræver kontinuerlig eller pulserende tilsætning). Brugen af stoffet er reguleret af myndighederne (alkohol).	Cox and Neville 2002
Formiat	●		●	BCI Culture	Vandig opløsning, kontinuert eller pulserende injektion. Recirkulation almindeligt.	Vigtigt mellemprodukt i bakterielle metaboliske processer.	Selvom formiat ofte er benyttet i laboratoriet, er der sjældent benyttet i feltet. Ikke egnet til passive systemer (kræver kontinuerlig eller pulserende tilsætning).	Findlay et al. 2002
Hydrogen gas (brint)	●				Biosparging (gas injektion) i pulserende tilsætninger	Fermenteringsproces ikke nødvendig. Giver øjeblikkeligt en kilde til hydrogenfrigivelse, der støtter reduktiv reklorering.	Frembrydende teknologi. Anvendeligheden er kun påvist på få lokaliteter. Den explosive egenskab af hydrogen er ofte en hindring for benyttelsen, da der kræves specielle helbreds- og sikkerhedsforanstaltninger. Stort tab af hydrogen gas til den umættede zone. Om metoden er rentabel i forhold til andre løsninger er ikke påvist.	Newell et al. 2000; 2001
HRC (Polylactat ester)		●			Batch injektion via lanseinjektion - enten som barriere eller et net af injektionspunkter i behandlingsområdet.	Udbredt anvendelse i USA - mest anerkendt af myndighederne. Metabolisk. Tilbyder de samme fordele som laktat.	Varemærkebeskyttet sammensætning af laktat der er dyrere end de fleste andre organiske elektrondonorer (fx natrium laktat). Påvist i nogle tilfælde at udvikle overproduktion af methan, hvilket kan hæmme den reduktive deklorering og/eller udløse bekymringer omkring indeklimate	Lodato et al. 2000; Murray et al. 2001; Railsback et al. 2001; Watts et al. 2000; Kean et al. 2002

Laktat	●		●	Pinellas; Bachman Road; KB-1	Vandig opløsning, kontinuert eller pulserende injektion. Recirkulation almindeligt.	Fødevarer tilsætningsstof. Velegnet for fermentering og generering af hydrogen. Høj vandopløselighed. Har af mulige elektrondonorer den mest effektive frigivelse af hydrogen. Ved kombination med tilsætning af Dehalococcoides kulturer og recirkulation, er fuldstændig nedbrydning til eten påvist.	Ikke egnet til passive systemer (kræver kontinuerlig eller pulserende tilsætning).	Murt et al. 2000; Leigh et al. 2000; Koch et al. 2001; Findlay et al. 2002
Methanol	●		●	KB-1	Vandig opløsning, kontinuert eller pulserende injektion. Recirkulation almindeligt.	Benyttet rutinemæssigt i kommunal spildevandsrensning. Velegnet for fermentering og generering af hydrogen. Høj vandopløselighed. Ved kombination med tilsætning af Dehalococcoides kulturer og recirkulation, er fuldstændig nedbrydning til eten påvist.	Ikke egnet til passive systemer (kræver kontinuerlig eller pulserende tilsætning). Stoffet er reguleret af og frembringer bekymringer for visse myndigheder.	Litherland et al. 1999; U.S. EPA 2000; Major et al. 2001; 2002; Langenhoff et al. 2001
Melasse		●			Batch injektion til boringer - enten som barriere eller et net af injektionspunkter i behandlingsområdet. Mest benyttet i magasiner med naturlig gradient.	Fødevarer tilsætningsmiddel, let bionedbrydeligt. Udbredt anvendelse i USA af enkelte firmaer.	Sukkerstoffer er ikke den mest effektive kilde til hydrogenfrigivelse ved fermenteringen. Ved tilsætning i stort overskud, er der et potentiale for påvirkning af grundvandskvaliteten med øget indhold af opløste organiske forbindelser og frigivelse af metaller. Kan også frembringe forhøjede værdier af sulfid og methan. Benyttes oftest som en passiv behandlingsmetode, som kræver store mængder af donor. Kan støde på problemer mht. blanding hvilket begrænser virkningsgraden. I nogle tilfælde kan frembragte høje koncentrationer af methan resultere i frigivelse af methanbobler der kan tilstoppe porøst medie.	U.S. EPA 2000; Morie et al. 2002; Peeples et al. 2001; Yang and McCarty 2003
Sojabønne olie/ Vegetabilsk olie/ Oleat		●	●	Pinellas	Permeabel reaktiv barriere (Biowall)	Langvarig, langsomt frigivende kilde af elektrondonor. Fødevarer tilsætningsmiddel.	Frembrydende teknologi. Kan sorbere nogle klorerhener for derved at forsinke deres nedbrydning. Ved tilsætning i stort overskud, er der et potentiale for påvirkning af grundvandskvaliteten med øget indhold af opløste organiske forbindelser og frigivelse af metaller. Kan også frembringe forhøjede værdier af sulfid og methan. Oftest benyttet som en passiv metode, der kræver store mængder af donor. Kan støde på problemer mht. blanding hvilket begrænser virkningsgraden. I nogle tilfælde kan frembragte høje koncentrationer af methan resultere i frigivelse af methanbobler der kan tilstoppe porøst medie.	Lee et al. 2000; Skladany et al. 2001; Nuyens et al. 2001; Boulicault et al. 2000; Yang and McCarty 2003
Vitamin B <sub>12</sub> / Titanium <sup>III</sup> Citrat	●				Vandig opløsning, kontinuert eller pulserende injektion. Recirkulation almindeligt.	Vitamin B <sub>12</sub> er et fødevarer tilsætningsmiddel, let bionedbrydeligt.	Frembrydende teknologi. Brug i feltet ikke udbredt. Ikke egnet til passive systemer (kræver kontinuerlig eller pulserende tilsætning).	Millar et al. 2001; Lesage et al. 2002

#### 4.4.2 Tilsætning af elektrondonor

Tilsætning af elektrondonorer og bakterier kan ske på mange måder. I protokollen fra ITRC 1998 ([www.itrcweb.org/isb-6.pdf](http://www.itrcweb.org/isb-6.pdf)) gennemgås nedenstående metoder:

- Recirkulation mellem 2 vertikale/horisontale boringer
- Direkte injektion i vertikal boring
- Recirkulation i samme vertikale boring med 2 filtre
- Passive vertikale filtersatte boringer som fyldes med elektrondonorer
- Tilsætning af elektrondonorer i biobarriere

Direkte injektion (direct push) med GeoProbe er meget anvendt i Nordamerika til injektion af de langsomt frigivende elektrondonorer (eksempelvis sojabønneolie, HRC, og kitin). Her foregår injektionen typisk under stort tryk. Ved tilsætning af HRC på Jægersborg Allé i Københavns Amt blev således anvendt GeoProbe med et tryk på 90 bar (Miljøstyrelsen, 2003a). HRC er typisk injiceret ved forhøjede temperaturer for at reducere viskositeten (Anderson et al., 2000; Boyle et al., 2000; Zahiraleslamzadeh et al., 2000; Miljøstyrelsen, 2003a). På Jægersborg Allé blev HRC eksemplvis opvarmet til 30-40 grader celcius (Miljøstyrelsen, 2003a).

Der er udviklet forskellige teknikker til at injicere elektrondonor med direct push teknologien. Der opereres bl.a. med begreberne "Top-down" og "Bottom-up". Top-down er injektion med start fra toppen af injektionsområdet og nedefter. Ved Bottom-up startes injektionen i bunden af magasinet. Ved passive systemer er det essentielt, at der sker en jævn fordeling af elektrondonorer i hele injektionsområdet. Her nævnes Top-down metoden som den mest velegnede løsning, idet Bottom-up metoden har en tendens til at fordele den største mængde substrat i bunden af injektionsområdet, specielt i lavpermeable aflejringer (Zahiraleslamzadeh et al., 2000). Problemer med uensartet fordeling af substrat blev også observeret ved Jægersborg Allé, hvilket blev tilskrevet for højt tryk, injektionssystem og variationer i permeabiliten i akviferen.

Tilsætning af elektrondonorer gennem drængrøfter er også en almindelig metode i Nordamerika. I Holland er der udviklet en teknik, hvor der anvendes tilsætning via nitrogengas i lighed med air sparging (se appendiks G, Bioclear, 2003).

Uden hensyn til typen af donor der benyttes, kan pneumatisk eller hydraulisk frakturering evt. tillade bedre grundvandsstrømning og bedre blanding af forurening af donor i lav permeable medier (Martin et al., 2002).

Ved benyttelse af bioaugmentation (tilsætning af bakteriekulturer) skal de tilsatte mikroorganismer bringes i direkte kontakt med forureningskomponenten. Begrænsninger mht. transport af mikroorganismer kan løses ved at tilsætte kulturen og derefter "trække" forureningen ind i behandlingsområdet ved at etablere en forøget hydraulisk gradient (forced gradient). Major et al. (2002) og Cox et al. (2002) demonstrerede brugen af denne metode til at injicere og sprede en bakteriekultur (**KB-1**) i sand- og grusmagasiner.

#### 4.4.3 Forbrug og levetid af donorer

Når behovet for donor skal vurderes, er der flere forhold, som skal tages i betragtning. Der vil være et forbrug af elektrondonor til omsætning af uorganiske elektronacceptorer (se afsnit 2.2), der strømmer ind eller findes i behandlingsområdet ( $O_2$ ,  $Fe(OH)_3$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_2$ , etc.). Der vil samtidig være et forbrug til selve dekloreringsprocessen, men det er typisk forholdsvis begrænset i forhold til forbruget til redoxprocesserne. Det andet forhold er tilgængeligheden af elektrondonoren for disse processer. Er der tale om donorer, som er umiddelbart tilgængelige eller er det donorer, som først skal frigives og derefter langsomt omsættes? Det støkiometriske behov kan beregnes ud fra reaktionsligninger præsenteret i kapitel 2 og 3 for veldefinerede donorer. I tabel 4.2 er der angivet teoretiske forbrug for at reducere elektronacceptorer i to danske akviferer. I sådanne beregninger er den største usikkerhed omkring forbruget formentlig knyttet til den biologiske tilgængelighed af jernhydroxider i grundvandsmagasinet. For komplekse donorer er der både problemer omkring den aktuelle støkiometri, men i særdeleshed omkring frigivelseshastigheden, som bliver afgørende for både forbrug og levetid af donor.

Forholdene omkring levetider af donorer er primært forbundet med passive systemer, hvor donorer såsom HRC, sojabønneolie, melasse eller kitin injiceres i mængder, der klart overskrider det støkiometriske krav for stimulering af den biologiske nedbrydning på kort sigt. Her vil reaktionen være styret af andre processer (diffusionshastigheden, opløsning), og den rette dimensionering af passive systemer kræver en kvantitativ forståelse af den hastighed, hvorved de fermenteringsdygtige substrater frigives fra materialet (fx HRC eller vegetabilsk olie) til grundvandet. I et forsøg på at forøge levetiden af langsomt frigivende og/eller passive donor systemer benyttes typisk mængder af elektrondonorer, der er i stort overskud (Burdick et al., 2002; Yang and McCarty, 2003). Ulempen ved dette er de tidligere nævnte problemer med dannelse af opløst mangan og jern (Fennell et al., 1997; Kean et al., 2002) og risikoen for ophobning af metangas (Yang og McCarty, 2003).

Ved aktive systemer med forceret gradient og konstant eller pulserende injektion af opløste, simple elektrondonorer (fx laktat, metanol, acetat) er donorerne typisk tilsat i koncentrationer, der møder de umiddelbare støkiometriske krav til reaktionen i vandfasen, hvorfor elektrondonorerne opbruges relativt hurtigt. Derfor er spørgsmålet omkring elektrondonorerers levetid mindre relevante for aktive systemer med forceret gradient.

Som støtte til anaerob deklorering af klorethener og klorethener kan bakteriel biomasse være en effektiv elektrondonor (Yang og McCarty, 2000b). Biologisk aktive zoner, der opbygges i forbindelse med aktive eller passive systemer, kan være rige på biomasse (Major et al., 2002). Eksperimenter har vist, at nedbrydning af biomasse i tidligere aktive zoner kan katalysere reduktiv deklorering i mindst 3 år efter, at de aktive afværgeforanstaltninger er afsluttet (Hendrickson et al., 2001). Dette indikerer, at aktive systemer kan have en signifikant effekt længe efter, at tilsætningen af elektrondonor er afsluttet.

#### 4.4.4 Tilklogning af boringer

Erfaringer fra talrige lokaliteter viser, at tilklogning af injektionsboringer kan resultere i en signifikant forringelse af muligheden for injektion af

elektron donor, og dette er det mest almindelige problem for drift og vedligeholdelse (MacDonald og Kitanidis, 1995; Taylor et al., 1997; Dupin and McCarty, 2000; Millar et al., 2001; Lesage et al., 2002). Tabel 4.5 giver en vurdering af forskellige metoder til fjernelse af biomasse, som giver tilklogningsproblemer (Alford et al., 1999; Donlan, 2000; Allison et al., 2000; Dupin et al., 2000; Taylor et al., 1997). Erfaringerne bygger på 20 lokaliteter med *in situ* afværge, hvor klorerede ethener, klorerede ethaner og perklorat er forsøgt nedbrudt i grundvand. Ud af disse 20 projekter havde kun 3 ikke stødt på problemer med vækst af biomasse. Den ene af disse sager er pt. under udførelse (Dover AFB i Delaware, USA) og kan evt. få problemer senere. I de to andre sager benyttes lavfrekvenspulserende tilsætning af donor (tilsætning én gang om ugen og én gang hver 5. uge), der måske ikke er egnet for mange lokaliteter. Alle på nær 4 af lokaliteterne benyttede kontinuerlig recirkulation af grundvand og tilsætning af donor via traditionelle injektionsboringer.

Der er ikke rapporteret om problemer med jernudfældninger. Det tilstræbes, at bibeholde anaerobe forhold i det vand, som skal recirkuleres.

Teknikker for afhjælpning af tilgroning benytter typisk forsøg på at hæmme eller gøre bakteriesamfundene uvirksomme mht. opbygning af biofilm ved benyttelse af oxiderende biocider eller koncentreret syre, fysisk fjernelse af biomassen i filterstrækningen eller benyttelse af tensider, dispergeringsmiddel eller chelateringsmiddel for at destabilisere forholdene i biofilmen. Kemiske løsninger kan være succesfulde, men de har den ulempe, at brugen af fx biocider over længere tid kan bevirke mikrobiel modstandsdygtighed (Allison et al., 2000), som kan have skadelige bivirkninger på den ønskede biologiske nedbrydning og grundvandskvaliteten. Tilførslen af kemiske biocider til grundvandet er i Nordamerika underlagt myndighedsgodkendelse i de fleste tilfælde (se kapitel 6).

På mange af de små lokaliteter, der er del af erfaringsgrundlaget i tabel 4.5, viste symptomer på tilgroning sig ved en pludselig stigning i vandspejlsniveauet i de injektionsboringer, der blev kørt med et konstant flow. Problemerne blev løst ved benyttelse af mange forskellige teknikker, hvor den mest almindelige var kraftig renpumpning ("purging"), der er en standardprocedure ved boringsretablering. Disse renoveringsteknikker er omkostningstunge og er ofte koblet sammen med tilsætning af aggressive kemikalier, som kan være både vanskelige og farlige at tilsætte. Desuden giver det oftest kun kortvarige forbedringer i driften. I en amerikansk undersøgelse evalueres potentielle cost-effektive boringsretableringsteknikker for afhjælpning af tilklogning af boringer i Leesville Dam, Leesville Ohio. Boringerne blev tilført polyfosfat, renpumpet i 2-4 timer og udsat for en choktilsætning af klor i koncentration på 1.000 mg/l i 12 timer, efterfulgt af kraftig renpumpning (Alford og Cullimore, 1999). Metoden var meget effektiv, men driftsomkostningerne var relativt store.

I det seneste år har GeoSyntec vurderet og/eller testet adskillige metoder til forebygning af tilgroning på mindre feltskalaniveau. Af disse, har brugen af klordioxid været meget effektiv til at forhindre tilgroning i feltforsøg over 4-6 måneder. Klordioxid benyttes normalt til desinficering af drikkevand og til at undgå biofilmdannelse i *ex situ* behandlingssystemer, køletårne og andre industrielle formål. En vigtig fordel ved brugen af klordioxid frem for andre klorbaserede desinfektionsmidler er, at det ikke udvikler trihalometaner. Nedbrydningsprodukterne er klorid og oxygen, der er naturligt tilstede i de fleste grundvandsmagasiner. Dog udgør både klordioxid og klorgas en betydelig helbreds- og risikofare (arbejds miljø).



På det seneste har GeoSyntec testet en ultralyds rør-resonator (UTR), der ødelægger biofilm og udfældninger i filtersætningen ved generering af ultralydssvingninger. Fordelen ved UTR-metoden er, at der ikke benyttes farlige kemikalier, den er uafhængig af redoxforhold, og driftsomkostningerne er lave. Metoden har været afprøvet med succes i en tilgroet injektionsboring, men metoden mangler stadig at blive testet for forebyggelsen af tilgroning af boringer over længere tid i fuld skala.

GeoSyntec har ligeledes erfaring med skiftevis injektion af elektrondonorer og rent vand, eksempelvis 1 times injektion af elektrondonorer og 23 timers injektion af vand.

Tabel 4.5. Sammenstilling af metoder til at modvirke tilkløgningsproblemer (Alford et al., 1999; Donlan, 2000; Allison et al., 2000; Dupin et al., 2000; Taylor et al., 1997).

Teknik	Fordele	Ulemper	Bemærkninger /usikkerheder	
Oxiderende biocider	Klorering	Stort spektrum af anvendelsesmuligheder; handelsvare kemikalie og udstyr der benyttes i drikkevandsbehandling; højreaktiv i grundvand og med begrænset transport fra injektionspunktet	Letomsætteligt af reaktioner indeholdende komponenter af biofilmmatrix (EPS); Hypochlorit/klogas kan udvikle giftige biprodukter (trihalomethaner); biomasse kan udvikle resistens; håndteringsmæssige bekymringer mht. klogas; reduceret effektivitet over naturlig pH	Klordioxid er den foretrukne form; kan kombineres med ammoniak for at danne kloraminer, der er et mere effektivt desinficeringsmiddel; almindeligt benyttet som boringsretableringsmiddel; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Bromering	Stærkere desinfektionsmiddel end klor med alkalisk pH; stort spektrum af anvendelsesmuligheder; højreaktiv i grundvand og med begrænset transport fra injektionspunktet.	Letomsætteligt af reaktioner indeholdende komponenter af biofilmmatrix (EPS); ikke så almindeligt benyttet som klor; kræver høje koncentrationer	Ikke påvist for grundvandstilsætninger; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Iodforbindelser	Reaktivitetsmæssig sammenlignelig med klor; almindeligt benyttet i fødevarerindustrien	Ineffektiv overfor sporelignende mikroorganismer; sandsynligvis højreaktiv med EPS i biofilmmatrix	Ikke påvist for grundvandstilsætninger; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Ozon	Stort spektrum af anvendelsesmuligheder; højreaktiv i grundvand og med begrænset transport fra injektionspunktet; hydrolyserer EPS	Letomsætteligt af reaktioner indeholdende komponenter af biofilmmatrix (EPS); potentiale for dannelse af epoxy- og bromatbiprodukter; stærkt ætsende (korroderende); kræver ozongenerator, der kun er tilgængelige i begrænsede størrelser	Spaltes til O <sub>2</sub> , hvilket resulterer i oxiderende forhold; Ikke påvist for grundvandstilsætninger; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Hydrogen Peroxid	Let at anvende; handelsvare kemikalie og udstyr; højreaktiv i grundvand og med begrænset transport fra injektionspunktet; rammer EPS ved subcidal koncentrationer	Ingen biocid-effekt; højreaktiv med visse almindelige mineraltyper; resulterer i varme/damp udvikling; begrænset industriel anvendelse	Spaltes til O <sub>2</sub> , hvilket resulterer i oxiderende forhold; begrænset brug i afværgeforanstaltninger; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Persyre	Stort spektrum af anvendelsesmuligheder ved lave koncentrationer; penetrerer biofilm; ugiftig	Ætsende (korrosiv) og ustabil; håndtering af stoffet er af potentiel bekymring	Nedbrydes til eddikesyre, hvilken er en elektrondonor; ikke påvist for grundvandstilsætninger; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
Ikke-oxiderende biocider	Alkoholer	Lettilgængeligt handelsvare kemikalie; let at anvende; kan udnyttes som elektrondonor til at støtte den biologiske nedbrydning	Antændelighed pålægger håndteringsomkostninger; kræver en høj koncentration; høje skatter er evt. pålagt ved køb af visse alkoholer (ethanol)	Methanol og ethanol er ofte benyttet som elektrondonor; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering og tidshorisonter
	Glutaraldehyd	Effektiv i lave koncentrationer; billig, ikke-korrosiv; nedbrydes til myresyre, der kan virke som elektrondonor til støtte for biologisk nedbrydning	Begrænset penetration af biofilmmatrix	Ikke påvist for grundvandstilsætninger; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering eller tidshorisonter
	Tetrakis(hydroxymethyl)fosfonium sulfat	Højeffektiv overfor sulfatreducerende bakterier; stort spektrum af anvendelsesmuligheder; sikker at håndtere; ikke-korrosiv; penetrerer biofilm	Ingen data om længerevarende skæbne i grundvand, inkl. påvirkninger af deklorerende mikroorganismer; ingen påvirkning af biofilmmatrix	Kommercielt tilgængeligt som "Tolcide (Rhodia)"; begrænset brug i afværgeforanstaltninger; tilsætning til grundvand kan være reguleret af myndighederne; ingen vejledning mht. dosering eller tidshorisonter

Dispergerings-middel/chelat-danner	Citronsyre	Sikker at håndtere; gøres ustabil i biofilmmatrix; handelsvare kemikalie; kan virke som elektrondonor til at støtte den biologiske nedbrydning	Sænker pH af det injicerede grundvand	Begrænset anvendelse i afværgeforanstaltninger; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Polymaleinsyre	Sikker at håndtere; gøres ustabil i biofilmmatrix; handelsvare kemikalie; kan virke som elektrondonor til at støtte den biologiske nedbrydning	Sænker pH af det injicerede grundvand	Kommercielt tilgængeligt som "NW310 (Johnson Screens)", der er udbredt i boringsretablering; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Glykolsyre	Sikker at håndtere; gøres ustabil i biofilmmatrix; udøver en bakteriel effekt	Sænker pH af det injicerede grundvand	Kommercielt tilgængeligt som "LBA (Cetco)", der er udbredt i boringsretablering; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Overflade-aktive stoffer (tensider)	Penetrerer og spreder biofilmmatrix; tillader mere effektiv tilsætning af biocider; ofte benyttet i boringsretablering	Behøver høje koncentrationer, dyrt kemikalie; er evt. mere effektiv til fjernelse end som forebyggelse	Ikke-ioniske tensider er almindeligt benyttet til boringsretablering, for at fjerne ler- og siltpartikler; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Polyfosfater	Destabiliserer biofilmmatrix og spreder lerpartikler; ofte benyttet i boringsretablering	Tilsætning til fosfatbegrænsede næringsstofforhold kan fremme mikrobiel vækst	Ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
Syrer	Saltsyre	Højeffektiv til fjernelse af udfældninger	Ikke effektiv overfor tilgroning med jernforbindelser; udvikler giftige gasser, kræver forsigtig håndtering; stort fald i pH (<1); produktet kan indeholde tungmetalsporstoffer	Almindeligt benyttet i boringsretablering; begrænset anvendelse for forebyggelse af tilgroning; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
	Sulfaminsyre	Relativt sikker at håndtere	Mindre surt end saltsyre; bevirker et kraftigt pH fald; kan indeholde sporstofurenheder; ikke effektiv overfor jern eller manganudfældninger	Almindeligt benyttet i boringsretablering; begrænset anvendelse for forebyggelse af tilgroning; ingen vejledning mht. dosering, tidshorisonter eller geokemiske konsekvenser
Andre	Enzymer	Rammer EPS og celler	Potentielt økonomisk uoverkommeligt; ingen industrielle eller felt anvendelser	Ikke en kommerciel teknologi
	Ultralyd	Potentiel god penetrering ind i filtersætningen; højeffektiv til fjernelse af udfældninger under statiske forhold; ingen kemikalietilsætning, let at anvende	Skal benyttes i forbindelse med et biocid; begrænset industriel anvendelse; høje omkostninger for individuelle måletransducerenheder; temperaturen indvirker på måletransducerens pålidelighed	Individueller måletransducerenheder kræves for hver boring; kommercielt tilgængelig fra "Telsonic"; er ikke en kendt teknik mht. afværgeforanstaltninger; evt. nødvendigt at lukke afværgesystemet ned inden anvendelse; begrænset virkningsradius
	Bakterier/-bakteriofag	Potentiel lav indflydelse på grundvandsgeokemien; rammer både bakterier og EPS	Muligvis stærkt specifik anvendelsesmulighed overfor kun få bakterier; ikke en afprøvet metode; bakteriofag har ingen indflydelse på EPS; tilsætning af partikler kan fremtvinge tilstopning	Ikke en kommerciel teknologi, mulige myndighedskrav mht. tilsætning af bakterielle partikler
	Termisk pasteurisering	Biocid effekt i filterstrækningen og omkringliggende filtersætning; benyttet sammen med biocider og tensider; varme forbedrer den kemiske reaktivitet	Høje energiomkostninger; kan stimulere biologisk vækst hvis anvendt uhensigtsmæssigt; potentiale for dannelse af kalkudfældninger	Kommercielt anvendt i vandforsyning og boringsretablering; er evt. ikke brugbar i injektionsboringer
	"AquaFreed"	Effektiv overfor bakterier og EPS; både fysisk, kemisk og termisk påvirkning; ugiftige biprodukter	For øjeblikket kun få levetandører af denne teknologi; potentiale for beskadigelse af boringens filtersætning; dannelse af kulsyre bevirker fald i pH	Den høje pris gør at metoden måske er mere anvendelig som en renoveringsteknologi
	Mekanisk rensning	Let at anvende; højeffektiv til fjernelse af udfældninger i filterstrækningen	Begrænset fjernelse af biofilm fra filtersætningen; kan kræve specialudstyr	Er typisk ikke benyttet til injektionsboringer i drift; kræver sandsynligvis hyppig anvendelse

#### 4.5 Bioaugmentation - tilsætning af bakteriekulturer

I litteraturen er der rapporteret gode erfaringer med stimulering af den reductive deklorering med tilsætning af bakterier (bioaugmentation). Udvalgte sager er præsenteret i tabel 4.6 og appendiks B. Før gennemførelse af feltforsøgene var der på forhånd på alle sager lavet treatability studies til vurdering af tilsætning af elektrondonorer og bakterier.

Cox et al. (2000) påviste fuldstændig deklorering af TCE og perklorat i en ca. 20 meter lang recirkulationscelle med en ekstraktionsboring, en injektionsboring og to monitoringsboringer placeret mellem injektions- og ekstraktionsboringerne. Grundvandet blev recirkuleret med en rate på ca. 20 liter/min, hvilket ved tracertilsætning blev bestemt til en opholdstid på 23 dage. Ethanol blev benyttet som elektrondonor, og behandlingsområdet var podet med en bakteriekultur indeholdende *Dehalococcoides*. Ellis et al. (2000) opnåede fuldstændig deklorering af TCE til ethen i en ca. 22 meter lang recirkulationscelle, der bestod af tre ekstraktionsboringer, tre injektionsboringer og en serie af monitoringspunkter imellem dem. En opholdstid på 60 dage blev opnået i projektet. Laktat blev benyttet som elektrondonor, og behandlingsområdet var podet med *Dehalococcoides* kulturer. Major et al. (2001, 2002) benyttede et lignende design, som det Cox et al. (2000) og Ellis et al. (2000) benyttede, på nær at opholdstiden var 7 dage. Alle tre projekter opnåede ved bioaugmentation fuldstændig og relativ hurtig omdannelse af klorethenerne til koncentrationer, der opfyldte stopkriterierne.

Resultaterne fra tabel 4.6 viser, at tilsætning af bakterier kan forcere oprensningen væsentligt, og at tilsætningen af bakterier ofte er nødvendigt for at sikre en fuld omdannelse til ethen. I litteraturen er der, som tidligere omtalt, bedst dokumentation for vellykkede projekter med aktive systemer (afsnit 4.1.4).

Tabel 4.6 Oversigt over udvalgte lokaliteter hvor der er anvendt bioaugmentation (se endvidere appendiks A.2)

Lokalitet	Forureningskomponent	Koncentration	Geologi	Bakteriekultur	Behandlet mættet jordvolumen	Tilsat volumen af kultur (L)	Skala	Reference
Dover Air Force Base, Dover, DE	TCE	5 mg/l	Sand, siltet	Pinellas	(12 x 18 x 3,1) m <sup>3</sup> , porevolumen ca. 200 m <sup>3</sup>	350	Pilot	Ellis et al. 2000
Kelly AFB, San Antonio, TX	PCE	2 mg/l	Grus, siltet, terrænnært	<i>KB-1</i>	(10 x 7,6 x 3,1) m <sup>3</sup> , porevolumen ca. 70 m <sup>3</sup>	13 (>10 <sup>6</sup> cells/ml)	Pilot	Major et al. 2002
Bachman Road, Lake Huron, Oscada, MI	PCE		Sand, finmelle	Bachman Road	(4,6 x 5,5 x 3,1) m <sup>3</sup> , porevolumen ca. 25 m <sup>3</sup>	200 (10 <sup>8</sup> cells/ml)	Pilot	Lendvay et al. 2003
Aerojet, Sacramento, CA	TCE	2 mg/l	Dybtliggende alluvial aflejring	<i>KB-1</i>	ca. 600 m <sup>3</sup> porevolumen	50	Pilot + Fuld	Cox et al. 2000; 2002
Caldwell Trucking NPL, NJ	TCE	200 mg/l (op til 680 mg/l)	Sprækket basalt	<i>KB-1</i>	-	160	Fuld	Finn et al. 2003
Industrial Site, Bosten, MA	TCE	80 mg/l (30-120 mg/l)	Sprækket klippe	<i>KB-1</i>	-	40	Pilot	Chang et al. 2002; 2003

#### 4.5.1 Bakteriekulturer

I tabel 2.6 er der en oversigt over bakteriekulturer, hvor evnen til anaerob deklorering af klorerede opløsningsmidler er dokumenteret. Tabellen giver også oplysninger om bakterierne er testet for patogener, og om de er kommercielt tilgængelige. I skema i appendiks A.2 (feltforsøg) er der angivet, om der er anvendt bioaugmentation, og hvilke kulturer der er anvendt.

Det fremgår, at de typiske bakteriekulturer, som har været anvendt i felten, er **KB-1**, Pinellas og Bachman Road. På enkelte oprensningssager (Fam et al., 2002; Manale et al., 2002) er der anvendt en ukarakteriseret bakteriekultur fra en anden forurennet lokalitet, hvor aktiv reduktiv deklorering pågik.

I Nordamerika bliver **KB-1** og Bachman Road kulturen solgt kommercielt til brug for bioaugmentation. **KB-1** er solgt gennem det nordamerikanske firma SiREM ([www.siremlab.com](http://www.siremlab.com)). Bachman Road kulturen er solgt gennem firmaet Regenesi ([www.regenesi.com](http://www.regenesi.com)) under navnet BioDechlor og gennem firmaet Bioaug LLC. Det er dog sandsynligvis ikke helt det samme produkt, som sælges af Regenesi og Bioaug LLC, idet bakterierne ikke opformerer under helt samme forhold.

I Europa er bakteriekulturer indeholdende **Dehalococcoides** også kommercielt tilgængeligt via det hollandske firma Bioclear BV ([www.bioclear.nl](http://www.bioclear.nl)), der sammen med firmaet Logisticon leverer on-site bioreaktorer til nedbrydning af klorerede ethener. Her bioaugmenteres oppumpet grundvand i reaktoren, og det behandlede grundvand reinfiltres i grundvandsmagasinet (se [www.avjinfo.dk/pdf/AVJinfo0503.pdf](http://www.avjinfo.dk/pdf/AVJinfo0503.pdf)).

#### 4.5.2 Vurdering af behov for bioaugmentation

Når behovet for bioaugmentation skal vurderes skal det ske på baggrund af en grundig feltundersøgelse af lokaliteten. Desuden er det ofte hensigtsmæssigt at supplere disse informationer med målrettede undersøgelser af de mikrobielle og nedbrydningsmæssige forhold. Som diskuteret i afsnit 2.3, er **Dehalococcoides** den eneste kendte bakteriestamme, der kan nedbryde *cis*-DCE og VC helt til ethen, og disse mikroorganismer findes ikke på alle lokaliteter (Hendrickson et al., 2002; Major et al., 2003). Tilstedeværelsen af **Dehalococcoides** er en kritisk forudsætning for at opnå en effektiv nedbrydning af klorethener til ethen. Som følge deraf er bestemmelsen af tilstedeværelsen af **Dehalococcoides** anbefalet for at evaluere muligheden for biologisk nedbrydning (Hendrickson et al., 2002). En anden mulighed er at udføre laboratorieforsøg (treatabilitystudier), som både giver en vurdering af behovet for bioaugmentation, men også kan benyttes til valg af donor og dimensionering af tilsætning af donor. Direkte påvisning af **Dehalococcoides** ved molekulære analyse er nøjere diskuteret i afsnit 2.4 og laboratorieforsøg (treatability studies) er behandlet afsnit 3.7. Her vil feltundersøgelser målrettet mod vurdering af behovet for bioaugmentation blive diskuteret.

##### **Feltundersøgelser**

Der er forskellige geokemiske forhold, der indikerer, når bioaugmentation er nødvendig for at forøge den biologiske nedbrydning af klorerede ethener i grundvand. Disse inkluderer:

- Iltrige forhold hvor der ikke er tegn på reduktiv deklorering. Iltrige forhold er hæmmende for tilstedeværelsen af **Dehalococcoides**, da ilt er toksisk for denne mikroorganisme.

- Lokalteter hvor der naturligt sker reduktiv deklorering med produktion af *cis*-DCE, men ingen eller kun meget lave koncentrationer af VC eller ethen. Lave koncentrationer af VC og ethen kan dannes naturligt gennem abiotiske processer, eller anaerobe co-metaboliske reaktioner.
- Ingen forekomst af VC eller ethen inden for 6 måneder efter tilsætning af elektrondonor. Denne tidsramme er baseret på en antagelse om, at maksimalt en 20-dobling (fordoblingstid på 5-10 dage afhængig af temperaturen) af den naturligt forekommende bestand af *Dehalococcoides*, resulterer i tilstrækkelig biomassevækst (fra 1 celle/ml til  $10^6$  celler/ml), se afsnit 4.5.3.
- Karakterisering af redoxforhold, herunder identifikation af aerobe forhold kan udføres på baggrund af vandopløselige redoxparametre (Bjerg og Arvin, 1998). En kontrolleret prøvetagning med feltmålinger af ilt, pH, EC med "prøvetagningsgris" suppleret med en "boringskontrol" er ofte den billigste måde at få det nødvendige datagrundlag. Det kan i lavpermable aflejringer være vanskeligt at få troværdige iltmålinger i lavtydende borer. Kvaliteten af sådanne iltmålinger bør altid sammenholdes med vurderinger af de øvrige redoxparametre.
- Målinger af ethen er ikke standard ved forureningsundersøgelser for klorerede opløsningsmidler i Danmark, og det afspejles også af den nuværende detektionsgrænse på 10 µg/l for kommercielle analyser (november 2003). I de få tilfælde, hvor der er publiceret målinger har baggrundsniveauet udenfor det forurenede område været under 10 µg/l (Miljøstyrelsen, 2003a; Miljøstyrelsen, 2000). Der er blevet målt markante koncentrationer (45 µg/l) på Drejøgade i enkelte borer i områder, hvor der pågik en aktiv anaerob deklorering (Miljøstyrelsen, 2000). Det vil være hensigtsmæssigt, at ethen bliver indarbejdet som standard i sager, hvor nedbrydning af klorerede opløsningsmidler skal vurderes. I vurdering af nedbrydning er det en god ide at vurdere forholdene mellem de enkelte nedbrydningsprodukter på mol basis, så det samtidig sikres, at ethen på molbasis udgør en signifikant del (>1 %) i forhold til både moderstof og nedbrydningsprodukter. Det samme gør sig gældende, når niveauet af VC skal vurderes. I Major et al. (2003) findes en interessant diskussion af denne problemstilling.

#### 4.5.3 Volumen af bakteriekoncentration

Der er mange faktorer, som har indflydelse på mængden af bakteriekultur, der skal tilsættes. Disse faktorer, og hvad de betyder for bakteriekulturen, er præsenteret i det følgende.

- Vækstraten for *Dehalococcoides* ved en given temperatur. Som en tommelfingerregel vil en positiv temperaturændring på 10°C fordoble vækstraten. Temperaturer under 4°C vil sandsynligvis hæmme væksten, mens temperaturer over 35°C vil forhindre vækst. Med forventede grundvandstemperaturer på mellem 5 og 15°C vurderes fordoblingstider på 5-15 dage at være realistiske.
- Bakteriekulturens populationstæthed. Jo højere den initiale populationstæthed er, desto mindre bakteriekultur behøves for at opnå

den ønskede celletæthed i akviferen. Kendskab til den initiale celletæthed i akviferen sammen med vækstraten for kulturen vil hjælpe med at kunne vurdere den forventede tilvænningsperiode. Erfaringerne på dette område er meget sparsomme og kvantitative vurderinger af vækst af *Dehalococcoides* under feltforhold er kun rapporteret i få tilfælde (se Lendvay et al., 2003).

- Volumen af behandlingsområdet, der skal gøres bioaktivt. Dette volumen er en funktion af den initiale koncentration af forureningskomponenterne, de estimerede nedbrydningsrater, den ønskede koncentration af forureningskomponenterne efter behandling og grundvandets strømningshastighed.
- Den minimalt ønskede tilvænningsstid før den anaerobe deklorering er effektiv, så der sker dannelse af ethen. Dette er en funktion af kulturens vækstrate og den initiale celletæthed i grundvandsmagasinet. Sædvanligvis vil en 10 gange forøgelse af kulturens volumen mindske fordoblingstiden af kulturen *in situ* 3,3 gange - fx ved at antage at ved en fordoblingstid på 5 dage vil tilføjelse af 10 gange mere kultur reducere tilvænningsperioden med ca. 17 dage (Durant., 2003).
- Systemdesign. Passive systemer for tilsætning af elektrondonorer er generelt afhængig af advektion, dispersion og diffusion for spredning af elektrondonorerne. Spredning af mikroorganismene vil også afhænge af disse forhold, og for at opnå de ønskede tilvænningsperioder i behandlingsområdet, skal kulturen derfor tilsættes i flere injektionspunkter for passive systemer end for recirkulationsbaserede systemer. Dette kan føre til behov for tilsætning af et større volumen bakteriekultur for at sikre en effektiv spredning af mikroorganismene.

Der er relativt få feltefaringer med bioaugmentation i forhold til biostimulation. På Kelly AFB, San Antonio (Major et al. 2002) blev der tilsat 13 l **KB-1** kultur med en koncentration på  $10^6$  celler/ml til et behandlet volumen på  $70 \text{ m}^3$ . Dette svarer til et tilsat bakterievolumen på 0,2 promille.

I sagen fra Oscada i Michigan (Lendvay et al. 2003) blev der tilsat 200 l bakteriekultur med en koncentration på  $10^8$  celler/ml til et behandlet volumen på  $25 \text{ m}^3$ . Dette svarer til et tilsat bakterievolumen på 8 promille, hvilket er en meget betydelig tilsætning.

#### 4.5.4 Levering, håndtering og tilsætning af bakteriekulturer

Fremgangsmåde for levering, håndtering og tilsætning af *Dehalococcoides* kulturer er beskrevet af Major et al. (2001, 2002), Cox et al. (2002), Chang et al. (2002, 2003) og Finn et al. (2003). Før indkøb af kulturen skal forhandleren bl.a. dokumentere følgende forhold:

- Kulturen skal være stabil over tiden, så der er sikkerhed for at specifikationerne overholdes
- Skal være fri for patogene bakterier
- Skal kunne købes i de rette mængder i forhold til den konkrete sag

- Skal være nem at håndtere, efter at den er leveret på lokaliteten

Kulturerne bør leveres til lokaliteten i beholdere, som sikrer, at ilt ikke kan trænge ind. Alle de flygtige organiske stoffer, der benyttes til at holde kulturen i live, og de tilhørende nedbrydningsprodukter, bør renses ud inden levering. Der bør foreligge en attest på, at kulturen er fri for flygtige organiske forbindelser inden leveringen. Beholderne bør pakkes således, at de er lette at håndtere, samt med opsamlingsbakker eller opsugende materiale i tilfælde af spild. Der bør foreligge både produktark og en plan for sikkerhed og sundhed.

Da *Dehalococcoides* kun er levedygtig under anaerobe forhold, er det ikke hensigtsmæssig at injicere bakterierne direkte ned i aerobe akviferer. Kulturen bør i stedet tilsættes efter en tilvænningsperiode, hvor elektrondonor tilsættes behandlingsområdet for at reducere redoxpotentialen og skabe geokemiske forhold, der er gunstige for de tilsatte mikroorganismer. Generelt bør tilsætning af kulturer først udføres, når koncentrationen af opløst ilt er under 0,5 mg/l, redoxpotentialen er under -100 mV og ideelt set, når der sker sulfatreduktion og/eller metanogese (Durant., 2003).

Inden tilsætningen af bakteriekulturer, bør injektionssystemet (rør og slanger mv.) renses ved tilsætning af nitrogen eller en anden inert gas, der kan fjerne ilt. Et headspace med nitrogen eller anden inert gas bør også opretholdes over kulturen under selve injektionen. Injektionen af kulturen skal foregå under grundvandsspejlet og i midten af filterstrækningen og skal kunne spredes og etableres i behandlingsområdet under tilstedeværelsen af elektrondonor i flere dage inden evt. recirkulering.

#### 4.6 Monitering af oprensningseffekten

Anvendelse af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering som afværgeteknologi er ikke lykkedes, før der er sket fuldstændig nedbrydning af de klorerede forbindelser til ethen og klorid. Det er relativt let for både passive og aktive biologiske systemer at opnå deklorering til *cis*-DCE, men mere besværligt for disse systemer at opnå fuld nedbrydning, specielt hvis *Dehalococcoides* ikke er tilstede i et tilstrækkeligt antal. Derfor mislykkes mange afværgeprojekter med både passive og aktive systemer, da der ikke sker fuldstændig nedbrydning. Desværre har der i litteraturen været en tendens til, at projekterne er erklæret en succes, hvis PCE eller TCE bare er nedbrudt til *cis*-DCE eller VC.

Formålet med et godt overvågningsprogram er, at bekræfte metodens anvendelighed, kvantificere fuldskala parametre og dokumentere overfor myndighederne, at metoden er i stand til at nedbryde klorerede opløsningsmidler. Der bør indsamles data til at måle behandlingseffekten, inklusive undersøgelser af den hydraulisk ledningsevne mellem monitoringspunkter, masseflux og koncentration af forurening, nedbrydningsprodukter, elektrondonor og uorganiske elektronacceptorer gennem behandlingsområdet (Morse et al., 1998). For systemer, der benytter bioaugmentation, bør det overvejes, om der skal udføres monitering for at påvise overlevelse, transport og aktivitetsniveau af de introducerede bakteriekulturer.

Uanset om der benyttes et aktivt eller passivt system, er data fra monitoringspunkter nedstrøms behandlingsområdet af minimal relevans, såfremt der ikke er god hydraulisk kontakt til behandlingsområdet. Pumpeforsøg alene er ikke nok til at påvise hydraulisk kontakt, da



vandstandspegling i observationsboringer ikke tilvejebringer bevis for, at der transporteres vand mellem pumpeboringen og observationsboringer. Tilsætning af en tracer er den bedste dokumentation for, at grundvandet fra behandlingsområdet har bevæget sig nedstrøms mod monitoringsboringerne (Morse et al., 1998; Ellis et al. 2000; Dybas et al., 2002; Major et al., 2002; Lendvay et al., 2003).

Det anbefales at gennemføre tracerforsøg inden tilsætningen af elektrondonorer, således at grundvandsstrømningshastigheder og hydraulisk opholdstid kan måles, og resultaterne kan benyttes til at optimere pumpning og/eller elektrondonortilsætning. For både passive og aktive systemer bør den hydrauliske sammenhæng spores over et lineært snit fra opstrøms til nedstrøms gennem behandlingsområdet. Wilson et al. (2002) bemærkede, at bio-barrierer kan reducere akviferers permeabilitet (enten ved gasproduktion eller ophobning af biomasse), således at lokale strømningsretninger blev ændret til at strømme udenom de nedstrøms monitoringspunkter. I dette tilfælde vil data fra nedstrøms monitoringsboringer ikke afspejle kvaliteten af grundvandet, der forlader behandlingszonen, og derfor skal det erkendes, at bio-barrierer kan ændre grundvandsstrømninger. Periodisk tracertilsætning bør derfor benyttes til at opnå hensigtsmæssige monitoringsdata.

#### 4.6.1 Monitoringsboringer

For pilotforsøg bør opstilling og afstand mellem monitoringsboringer baseres på de forventede grundvandsstrømningshastigheder (både under naturlig og forceret hydraulisk gradient) og de forventede nedbrydningsrater. For pilotforsøg med recirkulering anbefaler Morse et al. (1998) og en vejledning fra U.S. EPA (2000) brugen af flerdobbelte rækker af monitoringspunkter placeret på tværs af grundvandsstrømningen mellem injektions- og monitoringspunkter (se figur 4.3) for at sikre et godt grundlag for beregning af nedbrydningsrater. Morse et al. (1998) anbefaler, at længden af behandlingsområdet, pumperater og boringsplacering designes for en hydraulisk opholdstid på 35-40 dage ved naturlig grundvandsstrømning. På Jægersborg Allé blev der placeret boringer i et nærfelt (3-8 m nedstrøms) for at kunne få en vurdering af de lokale forhold omkring injektionen og et fjernfelt (25-30 m nedstrøms) for at sikre, at der kunne ses en signifikant nedbrydning (Miljøstyrelsen, 2003a). Placeringen af fjernfeltet svarede til en opholdstid på 60-75 dage med den vurderede porevandshastighed.

For fuldskala oprensning, bør overvågningsnetværket have tilstrækkelig rumlig udbredelse, både horisontalt og vertikalt, for at tillade en ordentlig vurdering af oprensningseffekten. Med hensyn til rumlig dækning er der ingen entydige krav til placering af monitoringspunkter ude i forureningsfanen, men tætheden af monitoringspunkter i nærheden af behandlingsområdet bør være større end længere ude i fanen for at sikre en effektiv måling af oprensningseffekten over lang tid (U.S. EPA, 2000).

Længden af filtrene og antallet af filtre over dybden er et væsentligt punkt i et monitoringsprogram. I en del af de rapporterede amerikanske forsøg og specielt sager rapporteret ved konferencer, er det et problem, at der ikke er detailinformation om den vertikale fordeling af fx elektrondonor og forureningen. I pilotforsøget på Jægersborg Allé blev der anvendt boringer med 3 filtre af en længde på 3,5 meter, da der ønskedes en god dækning over hele dybden, og det skulle være økonomisk overkommeligt (Miljøstyrelsen, 2003a). Disse filtre var egnede til at afklare, hvorvidt der var sket anaerob deklorerings i pilotforsøget, men var mindre egnede til at vurdere de aktuelle

mikrobiologiske og geokemiske processer pga. af opblanding over dybden. Det blev anbefalet, at der ved fremtidige projekter blev inkluderet boringer med korte filtre og evt. flere filtre over dybde.

#### 4.6.2 Monitoringsprogram

Monitoringsprogrammet ved pilotforsøg er bestemt af grundvandets strømningshastighed, forureningsmassefluxen ind i behandlingsområdet, den hydrauliske opholdstid og den forventede oprensningseffekt. Prøver bør udtages med en hyppighed, der sikrer en statistisk meningsfuld beregning af nedbrydningsrater. Generelt er udtagning af prøver hver anden uge nok til at spore ændringer (Cox et al., 2000; Major et al., 2002); dog er ugentlig vandprøvetagning udført i visse tilfælde (fx Dybas et al., 2002). Det kan være hensigtsmæssigt at anvende en kombination af synoptisk prøvetagning i alle boringer (snapshots) og tidsserier i udvalgte centrale boringer (Miljøstyrelsen, 2003a). Informationer ved synoptisk prøvetagning afslører, om der sker anaerob deklorering i randområder, og kan bruges til at vurdere spredning af elektrondonor og ændringer i strømningsmønstre. Tidsserier i udvalgte boringer er et meget stærkt værktøj sammen med en tracer. Hvis der ikke er medtaget en tracer, kan det være vanskeligt at vurdere, hvad der sker, hvis der er betydelige forskelle i indløbskoncentrationer af moderstoffer (se diskussion i Major et al., 2003) eller strømningsretninger.

Monitoringsprogrammet for fuldskala oprensninger er typisk dikteret af myndighedskrav. I indkøringsfasen (typisk de første 3 måneder) vil udtagning af dokumentationsprøver hver 2. uge være tilstrækkeligt. Derefter vil kvartalvis eller tilmed halvårlig udtagning være tilstrækkeligt i overensstemmelse med de lokale myndighedskrav.

For aktive systemer skal det nævnes, at monitoringsprogrammet for grundvandsprøvetagning vil være betydeligt forskelligt fra selve driften af systemet. Pumper, målere, rørføringer, tilførselssystem osv. vil kræve mindst ugentlig vedligeholdelse for visse systemer. Kontrol af trykopbygning, der kan indikere tilgroningsproblemer, skal overvåges rutinemæssigt gennem driftsforløbet. I mange tilfælde er driften af systemet kontrolleret via fjernbetjente SRO - anlæg (Cox et al., 2000; McMaster et al., 2003).

#### 4.6.3 Monitoringsparametre

Tabel 4.7 viser analyseparametre og forslag til analysefrekvens for pilotforsøg (ESTCP 2001). Et tilsvarende monitoringsprogram er rapporteret fra Jægersborg Allé (Miljøstyrelsen, 2003a), hvor der udover de nævnte parametre i tabel 4.7 er suppleret med mangan og sulfid. Der har også efterfølgende været udført brintmålinger for at belyse redoxprocesserne yderligere. Redoxparametre bør altid medtages, og her er det oftest billigst at foretage en boringskontrolanalyse, da den medtager de væsentligste parametre.

Koncentrationerne af klorerede opløsningsmidler inklusiv nedbrydningsprodukter, ethen og ethan er de vigtigste parametre til at måle effekten af den stimulerede anaerobe deklorering. For at påvise fuldstændig nedbrydning til ethen kan massebalanceberegninger benyttes til at påvise, at reduktionen er sket ved nedbrydning og ikke ved fortynding. Forekomsten af flygtige organiske syrer er især interessant, når der er tale om komplekse elektrondonorer, da omsætningen af disse kan være svært at forudsige.

Metan er en værdifuld analyseparameter, da den er en indikator på stærkt reducerende forhold. Forhøjede koncentrationer af metan viser også, at en stor del af de tilsatte elektronækvivalenter bliver benyttet af metanogene bakterier (eller spildt til ikke-deklorerende processer). En uheldig konsekvens af metanogene forhold er, at de kan udkonkurrere de deklorerende bakterier. Som følge deraf kan måling af metan også give værdifuld information mht., hvorvidt bakteriekulturen er hæmmet, samt om der er risiko for eksplosive koncentrationer af metan.

Tabel 4.7. Eksempel på monitoringsprogram for pilotforsøg (ESTCP, 2001).

Analyseparameter	Målelokalitet	Analysefrekvens
Opløst ilt	Felt	Hver 2. uge
Temperatur	Felt	Hver 2. uge
pH	Felt	Hver 2. uge
Fe <sup>2+</sup>	Felt	Hver 2. uge
Redoxpotentiale	Felt	Hver 2. uge
Klorerede opløsningsmidler	Laboratorium	Hver 2. uge
Opløst organisk kulstof	Laboratorium	Hver måned
Flygtige organiske syrer	Laboratorium	Hver måned
NH <sub>3</sub>	Laboratorium	Hver måned
CH <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	Laboratorium	Hver måned
NO <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> , SO <sub>4</sub>	Laboratorium	Hver måned
Cl, Br	Laboratorium	Hver måned
Ledningsevne	Laboratorium	Hver måned
Alkalinitet	Laboratorium	Hver måned
pH	Laboratorium	Hver måned

På lokaliteter, hvor bioaugmentation med *Dehalococcoides* kulturer benyttes, bør grundvandsprøver udtages til molekylær analyse før og efter tilsætningen af kulturen for at kunne påvise, om injektionen har været vellykket. Molekylær analyse kan benyttes til at følge spredningen og opformeringen af *Dehalococcoides* mikroorganismene i behandlingsområdet. Spredning og forøgelse af populationstætheden af *Dehalococcoides* over tid indikerer etableringen af kulturen i grundvandsmagasinet (Lendvay et al., 2003).

#### 4.7 Observerede nedbrydningsrater

Hastigheden hvorved PCE, TCE, *cis*-DCE og VC nedbrydes biologisk ved stimuleret *in situ* reduktiv deklorering kan variere betydeligt afhængig af forskellige stedbestemte faktorer indbefattende, om systemet er aktivt, eller passivt eller hvorvidt bioaugmentation er benyttet. Passive systemer uden bioaugmentation kan være år om at nedbryde TCE alene, og systemet går ofte i stå ved *cis*-DCE (se kapitel 2 og eksempler i appendiks B). De hurtigste nedbrydningsrater, som er rapporteret i videnskabelige artikler, er for aktive systemer med forceret gradient og bioaugmentation. Som vist i tabel 4.8, er halveringstiderne for nedbrydningen i størrelsesordenen timer til dage for PCE, TCE, *cis*-DCE, and VC. Major et al. (2002) observerede, at nedbrydningsraterne, der opnåedes i felten, var mere end en faktor 2 hurtigere

end det, der blev observeret i laboratorieforsøgene med sediment fra samme lokalitet.

Alle nedbrydningsrater skal dog tages med store forbehold, da de problemer omkring bestemmelse af troværdige rater, som blev diskuteret i afsnit 3.5, er de samme under feltforhold. Her er der desværre samtidig meget større usikkerheder om strømningshastigheder (hydrogeologisk variation), opholdstider og observerede koncentrationer.

Tabel 4.8. Nedbrydningsrater observeret ved aktive systemer med forceret hydraulisk gradient og tilførsel af *Dehalococcoides* kulturer.

Lokalitet	Reference	Design	Halveringstider (dage)			
			PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	VC
Aerojet, Sacramento	Cox et al. 2000	Recirkulation, 20 l pr. min. med ethanol som elektrondonor. Tilsat <i>Dehalococcoides</i> (KB-1)		6	12	13
Kelly Air Force Base, Texas	Major et al. 2002	Recirkulation, 28 l pr. min. med metanol og acetat som elektrondonorer; Tilsat <i>Dehalococcoides</i> (KB-1)	0.02	0.01	0.02	0.02
Bachman Road, Oscoda, Michigan	Lendvay et al. 2003	Recirkulation, med laktat som elektrondonor; Tilsat <i>Dehalococcoides</i> (Bachman Road kulturen)	20 (klørethener totalt)			

#### 4.8 Oprensningseffekt

Tabel 4.9 viser oprensningseffekt med reduktiv deklorering på udvalgte sager. De bedste oprensningseffekter er fundet på aktive systemer med anvendelse af bioaugmentation. Her er det lykkedes at oprense til under 10 µg/l. (Cox et al., 2002, Ellis et al., 2000, Hennsen et al., 2001, Lendvay et al., 2001, Major et al., 2001 og 2002, U.S. EPA., 2000). Lignende oprensningsniveauer er opnået i Holland (Ras N., 2004).

Flere af sagerne indikerer at det er nødvendigt at tilsætte bakteriekultur for at få en fuldstændig nedbrydning til ethen, idet nedbrydningen standser ved *cis*-DCE uden tilsætning af bakterier (Cox et al., 2002, Ellis et al., 2000, Hennsen et al., 2001, Leigh et al., 2000, Major et al., 2001 og 2002, U.S. EPA., 2000).

For passive systemer er oprensningseffekten typisk mindre. Sandefur et al. (2002) rapporterer om biostimulering af PCE med HRC i en grundvandsfane. PCE faldt fra 7.000 µg/l til 92 µg/l over 565 dage. Der blev efterladt restforurening med PCE og nedbrydningsprodukter på ca. 1000 µg/l. I litteraturen er disse oprensningsniveauer meget typiske for oprensning ved passive systemer. Det skal bemærkes, at for mange af de passive oprensningssager går nedbrydningen i stå ved *cis*-DCE. På den samme lokalitet (Sandefur et al., 2002) blev der ligeledes forsøgt oprensning af kildeområdet, hvor der var forekomst af fri fase. PCE indholdet blev reduceret fra 98.000 µg/l til under 250 µg/l i løbet af 565 dage. Restforureningen med nedbrydningsprodukter var dog meget høj, henholdsvis 43.900 µg/l af *cis*-DCE og 9.510 µg/l af VC. Maierle et al. (2001) beskriver en oprensning med brug af melasse som elektrondonor, hvor PCE indholdet i grundvandet blev reduceret fra 4000 µg/l til under detektionsgrænsen i løbet af 20 måneder. Indholdet af *cis*-DCE var under 300 µg/l og indholdet af VC var under 100 µg/l efter 20 måneder.

Der vil sandsynligvis også kunne ske en fuldstændig oprensning med passive systemer - litteraturgennemgangen tyder dog på, at oprensningstiden vil være noget længere end ved aktive systemer.

#### 4.9 Tidsperspektiv for afslutning af sager og tilbageslagsmålinger

Ud fra litteraturgennemgangen er det vanskeligt at vurdere tidshorizonten for oprensning med *in situ* reduktiv deklorering. Generelt er oprensningen i aktive systemer hurtigere end passive systemer. En tidshorizont på mindst 1-2 år for aktiver systemer vurderes at være et realistisk bud. I litteraturen er der dog ikke mange afsluttede sager med aktive systemer, idet disse sager typisk er gennemført som pilotforsøg.

For passive systemer vurderes oprensningstiden at være længere. Boyle et al. (2000) rapporterer om lukning af sag ved oprensning med HRC. Der er ikke tale om en fuldstændig oprensning, idet der efter 15 måneder stadig var høje indhold af klorerede opløsningsmidler tilbage (PCE: op til 4,7 mg/l, DCE: op til 18 mg/l, VC: op til 0,19 mg/l). HRC injektionen medførte dog en vis massereduktion, og myndighederne accepterede lukning af sagen på baggrund heraf. Det skal bemærkes, at der før HRC-tilsætning var sket oprensning med "dual phase extraction" af både den mættede og umættede zone.

Ovenstående er i tråd med erfaringer fra Holland (se appendiks G). Her regnes der med forventede oprensningstider fra 1,5 til 15 år, med de længste oprensningstider i leraflejringer. De typisk forventede oprensningstider er fra 3-5 år.

Railsback et al. (2002) rapporterer om lukning af oprensning af PCE forurening fra et renseri. Der er sket opgravning af kildeområdet og efterfølgende injektion af HRC til den mættede zone. Efter oprensningen var der dog stadig restforurening med klorerede opløsningsmidler (PCE: 408 µg/l, TCE: 88 µg/l, *cis*-DCE: 438 µg/l og VC: 132 µg/l). Det er desuden vanskeligt at vurdere, om det var opgravningen af kildeområdet, eller om det var injektionen af HRC, der medførte reduktion i forureningsindholdet. Der var således ingen tegn på reduktiv deklorering.

Maierle et al. (2001) rapporterer om lukning af oprensning af PCE forurening fra et renseri efter 2½ år. Ved injektion af melasse observeredes effektiv nedbrydning af PCE til ethen på 20 måneder.

Litteraturgennemgangen viser således kun få sager, hvor der er sket lukning af sager som følge af oprensning med *in situ* reduktiv deklorering. Ved passive systemer må der mindst forventes oprensningstider på 2-3 år. I mere lavpermeable aflejringer vurderes tidsperspektivet at være noget længere. Der kan dog godt ske en betydelig massereduktion på kortere tid (1-2 år). Det kan dog ikke forventes, at en forurening kan renses fuldstændig op på denne tid. Det skal hertil bemærkes, at en fuldstændig oprensning ikke altid vil være målet - en væsentlig massefjernelse kan i mange tilfælde være tilstrækkelig.

Tabel 4.9 Oprensningseffekt ved stimuleret reduktiv deklorerer for udvalgte sager.

Lokalitet/ reference	Koncentration (mg/l)	Skala 1)	Geologi	Redoxforhold	Elektron-donor	Bioaugmentation	Setup	Oprensningseffekt
Flybase, Californien, USA (Cox et al., 2002)	TCE: 2	P	Ikke oplyst	Aerob	Laktat	KB-1	Recirkulation	Biostimulation alene medførte ingen nedbrydning af TCE udover <i>cis</i> -DCE. 100 dage efter bakterietilsætning var indholdet af TCE, <i>cis</i> -DCE og VC under 5 µg/l og der var sket en fuldstændig nedbrydning til ethen.
Flybase, Delaware, USA (Ellis et al., 2000)	TCE: 7,5 <i>cis</i> -DCE: 1,2	P	Sand og silt	Aerob	laktat	Pinellas	Recirkulation	Nedbrydning af TCE ved biostimulation standsede ved <i>cis</i> -DCE (269 dage). 240 dage efter tilsætning af bakteriekultur var TCE og <i>cis</i> -DCE fuldstændig nedbrudt til ethen.
Industrigrund, Holland (Hennsen et al., 2001)	PCE: 50	F	Sand	Anaerob	laktat og acetat	Ja <sup>4)</sup>	2)	Nedbrydning af PCE og TCE ved biostimulation standsede ved <i>cis</i> -DCE. Tilsætning af bakteriekultur medførte fuldstændig nedbrudt til ethen efter 1-2 måneder.
Flybase, Californien, USA (Leigh et al., 2000)	TCE: 1,7 <i>cis</i> -DCE: 0,75	P	Sand, grus, ler	Ikke oplyst	laktat	Nej	Recirkulation	Indhold af TCE og <i>cis</i> -DCE var fuldstændig omdannet til VC og ethen/ethan efter ca. 2 måneder. Efter 450 dage var VC indholdet stadig højt (1000 u/l). Der skete således ikke en fuldstændig omdannelse til ethen og ethan.
Tidligere renseri, USA (Lendvay et al., 2001)	PCE: 0,9 <i>cis</i> -DCE: 2,5	P	Sand	Aerob-anaerob	Laktat	Bachman Road	Recirkulation	Tilsætning af laktat og bakteriekultur medførte en fuldstændig omdannelse af PCE til ethen i løbet af ca. 2 måneder. Indholdet af <i>cis</i> -DCE var under 10 µg/l.
Tidligere renseri, USA (Lendvay et al., 2003)	PCE: 1	P	Sand: fin-mellem	Aerob	Laktat	Bachman Road	Recirkulation <sup>3)</sup>	2 sideordnede testceller til sammenligning af biostimulation og bioaugmentation. I testcellen hvor der skete bioaugmentation blev 92 % af PCE omdannet til ethen i løbet af 6 uger. I testcellen hvor der alene skete biostimulering blev 76 % af PCE omdannet til ethen i løbet af 121 dage.
Tidligere renseri, USA (Maierle et al., 2001)	PCE/nedbrydningsprodukter: 1,5 – 4	F	Silt og sand	Ikke oplyst	Molasse	Nej	Passiv. Direkte injektion	Indholdet af PCE og nedbrydningsprodukter var reduceret fra 4000 µg/l til under detektionsgrænsen i løbet af 20 måneder. Dog restforurening med <i>cis</i> -DCE og VC med samlet indhold op til 400 µg/l.
Flybase, USA (Major et al., 2001 og 2002)	TCE: 80	P	Sand og grus	Sandsynligvis aerob	Methanol, acetat	KB-1	Recirkulation	Nedbrydning af PCE ved biostimulation standsede ved <i>cis</i> -DCE. Efter tilsætning af bakteriekultur skete der i løbet af ca. 200 dage en fuldstændig nedbrydning til ethen. Indhold af TCE, <i>cis</i> -DCE og VC var under 5 µg/l.
Industrigrund, Ohio, USA (Peeples et al., 2001)	<i>cis</i> -DCE: 0,45 VC: 0,2	P	Sand og grus	Ikke oplyst	Molasse	Nej	Recirkulation, direkte injektion	Biostimulering medførte 90 % omdannelse af <i>cis</i> -DCE og VC til ethen. Indhold af <i>cis</i> -DCE var under 25 µg/l og VC indholdet under 5 µg/l.
Industrigrund, Californien, USA (U.S. EPAC., 2000)	TCE: 17 Cr(IV): 100	P	Sand	Ikke oplyst	Molasse	Ja <sup>5)</sup>	Passivt. Direkte injektion	Både TCE og krom(VI) forureningen var reduceret gennemsnitligt med 99 % over 18 måneder. Koncentrationerne af TCE, <i>cis</i> -DCE og VC var typisk under 10 µg/l - dog blev der lokalt fundet <i>cis</i> -DCE koncentrationer på op til 350 µg/l.
Flybase, Delaware, USA (U.S. EPAd., 2000)	TCE: 7,5	P	Sand, indslag af silt og ler	Ikke oplyst	Laktat	Pinellas	Recirkulation	Nedbrydning af PCE ved biostimulation standsede ved <i>cis</i> -DCE. Ca. 180 dage efter tilsætning af bakteriekultur var alt TCE og <i>cis</i> -DCE fuldstændigt nedbrudt til ethen.
Industrigrund, Florida, USA (Harms et al., 2000)	TCE: 9 <i>cis</i> -DCE: 2	F	Sand	Sandsynligvis aerob	HRC	Nej	Passivt. Direkte injektion	Nedbrydning til VC og ethen efter 106 dage. Ophobning af <i>cis</i> -DCE nogle steder. Tilbageslag af TCE (op til 5000 µg/l) efter ca. 12 måneder i flere områder sandsynligvis pga. af manglende

								elektronodonor.
Renseri, Oregon, USA (Sandefur et al., 2002) Fane	PCE: 7	P	Sand	Ikke opløst	HRC	Nej	Passivt. Direkte injektion	PCE indholdet reduceret fra 7000 µg/l til 92 µg/l efter 565 dage. Restforurening med TCE, <i>cis</i> -DCE, VC var henholdsvis 159 µg/l, 672 µg/l, 145 µg/l
Renseri, Oregon, USA (Sandefur et al., 2002) Kildeområde	PCE: 98	P	Siltet ler	Ikke opløst	HRC	Nej	Passivt. Direkte injektion	PCE indholdet reduceret fra 98.000 til < 250 µg/l efter 565 dage i kildeområdet. Restforurening med TCE, <i>cis</i> -DCE, VC var henholdsvis 298 µg/l, 43.900 µg/l og 9510 µg/l

Note

- 1) P: pilotforsøg, F: fuldskala
- 2) Kontinueret injektion af biomassekultur fra lokaliteten. Diskontinueret levering af elektronodonor
- 3) 2 testceller: 1 celle med biostimulation og 1 celle med bioaugmentation
- 4) Opformeret bakteriekultur i bioreaktor fra lokaliteten
- 5) Biomasse fra spildevandsanlæg (anaerobt)

## 5 Risikoforhold ved stimuleret anaerob nedbrydning

I dette afsnit præsenteres erfaringerne med myndighedsbehandling vedrørende stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. Forholdene i Danmark og Europa er beskrevet først. Dette er suppleret med forholdene i Nordamerika, hvor denne teknologi er mest udbredt, og der derfor foreligger et bedre erfaringsgrundlag.

### 5.1 Forhold i Danmark

Der er kun et lille erfaringsgrundlag mht. tilsætning af næringsstoffer og mikroorganismer i forbindelse med *in situ* oprensninger i Danmark. De fleste erfaringer er opnået med oprensning af olieforureninger typisk terrænnært og i den umættede zone. Der er i Danmark ikke erfaringer mht. stimuleret reduktiv deklorering med tilsætning af bakteriekulturer. Dog er der et enkelt projekt i Københavns Amt, hvor der er tilsat HRC som elektrondonor til nedbrydning af PCE (Miljøstyrelsen, 2003a).

#### 5.1.1 Lovgivning

Tilsætning af bakterier til grundvandet samt en eventuel recirkulering af bakterieholdigt grundvand kræver normalt en tilladelse i henhold til miljøbeskyttelseslovens § 19, stk. 1. Der står, at stoffer, produkter og materialer, som kan forurene grundvand, jord og undergrund, ikke uden tilladelse må 1) nedgraves i jorden; 2) udledes eller oplægges på jorden; eller 3) afledes til undergrunden. Amtet er tilladelsesmyndighed i henhold til § 19, stk. 4. Krav til eventuel monitoring vil blive fastlagt af amtet i forbindelse med tilladelsen og indgå som et vilkår i denne (Miljøstyrelsen 2003b).

Dog gælder i henhold til jordforureningslovens § 63, at hvis der er tale om undersøgelser eller afværgeprojekter i forbindelse med den offentlige indsats, kan disse gennemføres uden tilladelse efter bl.a. miljøbeskyttelsesloven og vandforsyningsloven. Det er en forudsætning, at der er tale om et egentligt afværge- eller undersøgelsesprojekt. Amtsrådet kan afgøre, hvorvidt en sag falder ind under den offentlige undersøgelses- og afværgeindsats (Miljøstyrelsen 2003b).

Selve bakteriekulturen skal ikke godkendes/tillades af myndighederne inden anvendelse. Det er den faktiske anvendelse, som skal godkendes. Såfremt der er tale om genmodificerede organismer, skal der indhentes tilladelse hos Skov- og Naturstyrelsen, jf. bekendtgørelse nr. 831 af 3. december 2002 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer (Miljøstyrelsen 2003b).

#### 5.1.2 Erfaringer i Danmark

##### **5.1.2.1 Miljøstyrelsen**

Der er iflg. Miljøstyrelsen ikke erfaringer med tilsætning af bakteriekulturer til grundvandet med henblik på at oprense forurenede grundvand i Danmark.



Miljøstyrelsen har ikke kendskab til danske projekter, dog er der i forbindelse med et forskningsprojekt ved Avedøre givet en tilladelse til GEUS til tilsætning af bakteriofagerne (virus) MS-2 og PDR-1 til grundvandet, hvor disse skulle anvendes som tracer. Københavns Amt gav i henhold til Lov om Miljøbeskyttelse § 19, tilladelse til udførelse af tracerforsøget i 1993. Vilkaerne for denne tilladelse er Miljøstyrelsens gældende praksis på området (Miljøstyrelsen, 2003b):

- Kontrol af bakteriofag-suspensionen for vækst af hhv. bakterierne *Escherichia coli* og *Salmonella typhimurium*.
- Kontakt til kommunen inden igangsætning.
- Udtagning af vandprøver før og efter til kemiske og bakterielle analyser samt efterfølgende afrapportering til kommune og amt.
- Tilladelsen var gældende i 1 år.

Amtets afgørelse kunne i denne sag ankes af afgørelsens adressat, Embedslægeinstitutionen, kommunen, Danmarks Naturfredningsforening samt enhver der havde individuel og væsentlig interesse i sagens udfald, jf. Miljøbeskyttelseslovens § 98-100 /1/. Dette er i dag stadig gældende, med enkelte tilføjelser i henhold til Bekendtgørelse af lov om miljøbeskyttelse (Miljøbeskyttelsesloven) kapitel 11.

#### **5.1.2.2 Amter**

Der er kun få erfaringer i danske amter med tilsætning af bakteriekulturer til jord og sekundært grundvand. Erfaringerne er typisk afprøvning af kommercielle produkter til nedbrydning af olieforureninger, såsom Bio-Gel™ eller BioCap®, og der stilles normalt ikke krav til produktet, på nær om det er genmodificeret eller indeholder patogener. Omfanget af myndighedsbehandlingen afhænger af de enkelte amter. Der er udført telefoniske forespørgsler til følgende amter: Københavns Amt, Frederiksborg Amt, Roskilde Amt, Vestsjællands Amt, Fyns Amt, Storstrøms Amt, Vejle Amt og Århus Amt.

Københavns Amt har erfaringer med tilsætning af HRC fra Jægersborg Allé (Miljøstyrelsen, 2003a). Myndighedsbehandlingen bestod i en ansøgning til amtets egen godkendende myndighed på grundvandsområdet. Ansøgningen bestod i en beskrivelse af lokaliteten og HRC produktet. Københavns Amt har haft 2-3 frivillige oprydninger i den umættede zone, hvor der blev tilsat produkter til nedbrydning af olieforureninger (Bio-Gel™ eller BioCap®). Der var i disse tilfælde ikke nogen speciel myndighedsbehandling, og der har ikke været stillet specielle krav til produkterne (Københavns Amt, 2003).

Frederiksborg Amt har erfaringer med 2 projekter i den umættede zone, hvor der blev tilført næringsstoffer. Udover de generelle undersøgelses- og monitoringskrav er der ikke krævet yderligere undersøgelser eller risikovurderinger. Kravet til produktet var, at det ikke måtte være forurenende eller indeholde miljøfremmede stoffer (Frederiksborg Amt, 2003).

Storstrøms Amt har ingen erfaringer med tilsætning af bakteriekulturer eller substrater. Dog havde amtet erfaringer med reinjektion (nedsivning) af behandlet grundvand, hvor grundvand med fri oliephase bliver pumpet, behandlet og nedsivet i behandlingsområdet. Nedsivningstilladelsen var givet af amtet i henhold til spildevandsbekendtgørelsens § 30 (Storstrøms Amt, 2003).

Vejle Amt har afprøvet Bio-Gel™ produktet i den umættede zone og i terrænnært sekundært grundvand. Der var krav om proceskontrol mht. injektion og oppumpning i det behandlede område, og beregninger blev udført mht. spredningen af produktet. Der blev ikke krævet dokumentation af produktet, ud over at det skulle være naturlige bakteriestammer. Leverandøren har desuden fået produktet testet på Teknologisk Institut, der ikke kunne konstatere nogen forureningsfare (Vejle Amt, 2003).

Fyns Amt har erfaring med en enkelt sag hvor Bio-Gel™ blev benyttet. Amtet blev først informeret om afværgeforanstaltningerne efter udførslen, og det var den pågældende kommune, der tillod tilsætningen (Fyns Amt, 2003).

Roskilde, Vestsjælland og Århus amter har ingen erfaringer med tilsætning af bakteriekulturer.

## 5.2 Forhold i Europa

Lovgivningen i Europa er forsøgt belyst ved kontakt til det Europæiske Miljøagentur (European Environment Agency), den hollandske miljøstyrelse og hollandske firmaer med erfaringer mht. dette emne. Holland er valgt på basis af landets udvikling indenfor jord- og grundvandsoprensninger, hvor de i Europa er et af de førende lande indenfor netop dette område. Desuden er Holland på mange måder sammenlignelig med Danmark.

Spørgsmålene er stillet specifikt mht. *in situ* reduktiv deklorering, og der er søgt informationer om generelle erfaringer inden for området, lovgivning og myndighedsbehandling.

### 5.2.1 Det Europæiske Miljøagentur

Det Europæiske Miljøagentur har ikke administrative erfaringer med tilsætninger af mikroorganismer til grundvand. EU-lovgivningen er desuden udenfor Det Europæiske Miljøagents område, men styres af EU kommissionens "Directorate General of Environment". Der er ikke rettet henvendelse til denne instans, da det vurderes, at forespørgslen er for specifik i EU sammenhæng.

### 5.2.2 Erfaringer i Holland

Den hollandske miljøstyrelse har erfaringer med *in situ* tilsætning af mikroorganismer til nedbrydning af klorerede opløsningsmidler. Der er ingen specielle krav mht. tilsætning af mikroorganismer til jord og grundvand i Holland, da mikroorganismene normalt bliver isolerede og opformerede fra andre grunde, hvor nedbrydning af klorerede opløsningsmidler foregår naturligt. Miljøstyrelsen henviser til to hollandske firmaer mht. erfaringer på området, Bioclear BV og Tauw BV (SKB 2003).

Det hollandske firma Bioclear BV har stor erfaring med naturlig nedbrydning og stimuleret reduktiv deklorering (bioaugmentation). De har udviklet et koncept med en anaerob bioreaktor til opformering af bakteriekulturer. Konceptet er beskrevet i AVJ info nr. 5 2003 ([www.avjinfo.dk/pdf/AVJinfo0503.pdf](http://www.avjinfo.dk/pdf/AVJinfo0503.pdf)). Myndighedsbehandlingen har bl.a. bestået i at overveje, i hvilket omfang injektion af substrat og biomasse vil kunne accepteres (Bioclear BV 2003).

Tauw BV har stor erfaring med stimuleret biologisk nedbrydning, men begrænset erfaring med bioaugmentation. De har været i kontakt med de flamske myndigheder (OVAM) mht. et pilotprojekt i Flandern. Kontakten bestod i at informere myndighederne om den bakteriekultur, der skulle benyttes. Myndigheden har for nylig godkendt bakteriekulturen, og pilotprojektet er netop startet. Tauw vurderer i forbindelse med andre projekter i Holland, at der ikke vil opstå problemer med at få godkendt tilsætningen af bakteriekulturer og substrat (Tauw BV 2003). Godkendelsen gives af de enkelte selvstændige provinser, hvilket er sammenligneligt med de danske amter og deres behandling af miljøsager.

### 5.3 Forhold i Nordamerika

I appendiks E er der en detaljeret gennemgang af myndighedsbehandlingen i Nordamerika. I dette afsnit gives et uddrag af de væsentligste forhold ved myndighedsbehandlingen.

#### 5.3.1 Tilsætning af elektrondonorer til grundvand

Stimuleret *in situ* reduktiv deklorering skaber midlertidigt en lokal forandring af grundvandskvaliteten ved tilsætning af elektrondonorer, idet der skabes reducerede forhold (forbruger elektronacceptorer), dannelse af opløst jern og mangan, sulfid og metan. I USA er midlertidig og lokal forandring af grundvandskvaliteten ved tilsætning af fermenterede substrater (mange er fødevarerforbindelser) tilladt, da disse substrater benyttes til at fjerne organiske forureninger fra grundvandet. Generelt er processen accepteret, fordi den skaber en netto reduktion af toksicitet og risikoforhold, også selvom udledning af elektrondonorer i grundvandet skaber nye - men midlertidige - påvirkninger af grundvandet.

Florida og Californien har etableret detaljerede administrative retningslinier m.h.t. injektion af fermenterbare elektrondonorer og andre *in situ* tilsætningsstoffer. Underground Injection Control (UIC) krav i Florida forbyder udledning af stoffer til drikkevandsmagasiner, da det kan forårsage overskridelse af primære og sekundære grænseværdier. Dog har miljømyndighederne i Florida, Florida Department of Environmental Protection (FDEP) udviklet et program, der giver grundejere tilladelse til at ansøge om en variant af UIC kravene, hvilket tillader, at der bliver skabt en midlertidig påvirkning af grundvandsmagasinet i behandlingsområdet. I Californien er det "California Regional Water Quality Control Board", CARWQCB, der administrerer "Waste Discharge Requirement" (WDR) tilladelser i hele staten. Der stilles krav om, at enhver person, der udleder eller påtænker at udlede stoffer til andet end det kommunale kloakanlæg, således at vandkvaliteten i staten kan påvirkes, skal indsende en ansøgning om udledningen til de regionale myndigheder. De regionale myndigheder fastsætter derefter kravene til udledningen eller den foreslåede udledning. WDR tilladelser er nødvendige til enhver aktivitet, der involverer udledning af spildevand eller kemisk påvirket vand til overflade- eller grundvand, inkl. injektion af elektrondonorer til *in situ* nedbrydning af klorerede opløsningsmidler.

#### 5.3.2 Patogene stoffer og tilsætning af bakteriekulturer

I USA er der ingen føderative eller statslige forbud mod brugen af ikke-genetisk udviklede bakteriekulturer (blandede) til oprensning af jord og

grundvand. De seneste publikationer fra den amerikanske miljøstyrelse, USEPA, om brugen af UIC tilladelser (Underground Injection Control) tilkendegiver, at bioaugmentation kan overvejes som afværgeløsning (fx U.S. EPA 1999 <http://www.epa.gov/safewater/uic/classv/pdfs/volume16.pdf> ).

Selvom den amerikanske miljøstyrelse ikke regulerer brugen af bakteriekulturer til *in situ* afværge med stimuleret biologisk nedbrydning, er det sikkert, at visse bakteriekulturer berettiger nøjere undersøgelse mht. deres patogene egenskaber. Historisk set har fx *Burkholderia Cepacia* været brugt til bioaugmentation for aerob cometabolsk *in situ* biologisk nedbrydning (Bourquin et al., 1997), og kulturen blev for nylig identificeret som mulig patogen i forbindelse med cystisk fibrose (Holmes et al., 1998; Vandamme et al., 1997).

I Canada er brugen af mikroorganismer til biologisk nedbrydning reguleret af den canadiske miljøstyrelse, Environment Canada, under de gældende miljølove (Canadian Environmental Protection Act (CEPA)). Både naturligt forekommende og genetisk forarbejdede mikroorganismer er strengt reguleret i henhold til miljøloven. Environment Canada (2001) har udgivet retningslinier for bekendtgørelse og undersøgelse af nye organismer mht. patogene egenskaber (se fx <http://www.ec.gc.ca/substances/nsb/download/Bioge1201.PDF>)

### 5.3.3 Reinjektion af forurenede grundvand

I Californien og Florida kan tilladelser for recirkulation af forurenede grundvand for *in situ* biologisk nedbrydning gives af henholdsvis WDR (Waste Discharge Requirement) og UIC, så længe at andre regulative forhold overholdes. Injektion af forurenede grundvand, der er tilsat behandlingsmidler, betragtes med bekymring af de amerikanske myndigheder. Indtil for nylig var det svært for den godkendende myndighed at tillade reinjektion af forurenede grundvand ved *in situ* afværgeforanstaltninger på grund af de gældende UIC love og bestemmelser. I december 2000 udsendte den amerikanske miljøstyrelse dog en erklæring, der udtrykkeligt tillader injektion og/eller recirkulering af forurenede grundvand til *in situ* biologiske nedbrydningsformål (U.S. EPA 2000 - <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/ca/resource/guidance/remwaste/refrnc es/pol-mem3.pdf>).

## 6 Økonomi

I dette afsnit gives der en oversigt over typiske udgifter til stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. I Danmark er der pt. kun forsøgt gennemført én pilotskala oprensning (Jægersborg Allé i Københavns Amt), hvorfor erfaringsgrundlaget herhjemme er meget lille. Der udføres på nuværende tidspunkt (november 2003) ikke laboratorieforsøg (treatability test) kommercielt i Danmark.

De økonomiske vurderinger i dette afsnit er derfor primært hentet fra oprensninger fra USA. Priserne kan dog ikke umiddelbart overføres til Danmark, men giver dog et fingerpeg om størrelsesordenen af udgifterne.

### 6.1 Erfaringer fra Danmark

Ved oprensningen i pilotskala på Jægersborg Allé (Miljøstyrelsen, 2003a) blev der tilsat 1.860 kg HRC og HRC Primer (mere tyndtflydende substrat) til den mættede zone. Til injektionen blev der anvendt en Geoprobe borerig med "direct push" teknik. Der blev injiceret HRC i 5 punkter og HRC Primer i 4 punkter i et zig-zag mønster på tværs af grundvandsstrømningsretningen, centralt i forureningsfanen. Oprensningen var designet som et passivt system, hvor substratet langsomt opløses af indstrømmende grundvand og herefter spredes nedstrøms. Der blev injiceret substrat én gang.

Udgifterne til projektet er vist i tabel 6.1. Udgifter i forbindelse med Miljøstyrelsens Teknologiprogram er ikke medtaget. For elektrondonoren er der angivet erfaringspriser, da det i projektet blev leveret gratis af udbyderen. I forsøget blev det beregnede behandlede vandvolumen opgjort til 5.225 m<sup>3</sup>. Med denne vandmængde ligger behandlingsprisen på ca. 170kr/m<sup>3</sup>. Som beskrevet i afsnit 4.1.1 gav injektionen af HRC ikke den ønskede stimulering af den anaerobe deklorering (Jacobsen et al., 2002; Miljøstyrelsen, 2003a).

Tabel 6.1 Økonomisk overslag for oprensningen på Jægersborg Allé i Københavns Amt.

Enhedsomkostning	Omkostning (kr excl. moms)	% af total	Antagelser
Etablering	300.000	34%	Behandling af 1 års grundvandstransport, akviferdybde 10 m, fanebredde 10 m. <b>Etablering:</b> 9 injektionspunkter med Geoprobe, Injektion 1 gang. 7 monitoringsboringer med 3 filterstrækninger. 4 analyserunder. <b>Substrat:</b> 1860 kg HRC og HRC primer (dog leveret gratis). <b>Honorar:</b> dækker sagsbehandling, koordinering og tilsyn med feltarbejde, vandprøvetagning og rapportering.
Drift	0	0%	
Analyser	100.000	11%	
Substrat	200.000	22%	
Honorar	300.000	33%	
Total	900.000		

### 6.2 Erfaringer fra Nordamerika

#### 6.2.1 Elektrondonorerer

Tabel 6.2 viser en opstilling af enhedspriser (US\$) for opløselige og langsomt frigivende elektrondonorerer. Hvor det er muligt, er priserne tilrettet således, at vægten af vand eller viskositetsreducerende stoffer er fratrukket. Som vist i

tabellen er langsomt frigivende elektrondonorer generelt dyrere pr. kg end de opløste elektrondonorer. Betragtet som masse pr. masse enhed er oprensningseffekten af disse donorer ikke ækvivalente (se kapitel 2 og 3). Nogle af disse donorer danner mere hydrogen end andre (fx laktat), mens nogle genererer mere metan end andre (fx spiseolier).

Til sammenligning koster HRC i Danmark omkring 85 - 120 kr/kg afhængig af mængden (Miljøstyrelsen 2003a). Ifølge forespørgsel til firmaet Sigma-Aldrich koster 1000 kg laktat ca. 29.000 kr excl. moms. Det er noget højere end de angivne priser i USA i tabel 6.2, men prisniveauet vil formentlig i fremtiden være stærkt afhængig af efterspørgsel, mængder og krav til produktet (indhold af urenheder).

Der ses stor prisforskel mellem de enkelte donorer. HRC er klart den dyreste, mens sojabønneolie, metanol, ethanol og melasse er i den billige ende. Ved små sager betyder omkostningerne til elektrondonorer ikke så meget, men ved stort forbrug af elektrondonorer er elektrondonorer en væsentlig udgiftspost.

Tabel 6.2. Priseksempler (ved store mængder) på opløselige og langsomt frigivende elektrondonorer (omregnet fra Harkness, 2000; ITRC/RTDF 2003).

Elektrondonor	Pris i US\$/kg*
<i>Opløselige elektrondonorer</i>	
Metanol	0.11
Ethanol	0.45 – 0.55
Melasse	0.45 – 0.9
Natrium benzoat	1,1 – 1,7
Natrium laktat	1,9 – 2,2
<i>Langsomt frigivende elektrondonorer</i>	
Spiselige olier (sojabønneolie)	0.44 – 1,1
For-emulgerede olier	3,3 – 4,4
Kitin	4,5 – 6,7
Methylcellulose	9 – 11
HRC™	13 – 16,5

\* 1999 priser

## 6.2.2 Bakteriekulturer

Der er som diskuteret i afsnit 4.5.1 i øjeblikket to bakteriekulturer, som indeholder *Dehalococcoides* tilgængelige på det amerikanske marked. **KB-1** kulturen koster typisk 1,3-2,6 US\$/m<sup>3</sup> mættet akvifer) for store lokaliteter, og 6,5-13 US\$/m<sup>3</sup> mættet akvifer) for mindre lokaliteter. Det har ikke været muligt af få oplyst prisen på Bachman Road kulturen.

I Europa er bakteriekulturer, der indeholder *Dehalococcoides* også kommercielt tilgængeligt gennem Bioclear BV, der leverer on-site bioreaktorer til nedbrydning af klorerede ethener. Bioclear BV leverer ikke bakteriekulturer alene men hele on-site opstillingen. Prisen for leje og opstilling af bioreaktorer afhænger af den specifikke lokalitet.

I de fleste tilfælde i Nordamerika udgør tilsætning af bakterier ca. 5% af etableringsudgifterne for anlæg til biologisk afværge. I kontrast til elektrondonortilsætning er tilsætningen af bakteriekulturer typisk udført ved en enkelt tilsætning. **KB-1** kulturen leveres med en begrænset garanti, der

indebærer, at såfremt deklorering til ethen ikke opnås i behandlingsområdet, vil yderligere tilsætninger af **KB-1** kultur blive udført uden meromkostning.

### 6.2.3 Laboratorietest

Ifølge (ITRC/RTDF 2003) er omkostningerne for et typisk laboratorieforsøg i størrelsesordenen 10-20.000 US\$. Som beskrevet i kapitel 3.11 består laboratorieforsøg normalt i opbygning af en serie flaskeforsøg med sediment og grundvand tilsat forskellige elektrondonorer og evt. bakteriekulturer. Omkostningerne ved laboratorieforsøg er en funktion af antallet af flaskeforsøg, antal behandlinger, varigheden af undersøgelsen og antallet af analyser under forsøget. Inkluderer afrapportering kan omkostningerne ofte løbe op i over 20.000 US\$ (afhængig af detaljeringsgraden).

### 6.2.4 Pilotforsøg

Omkostningerne til et pilotforsøg kan variere betydeligt afhængig af størrelsen af forsøgsområdet, hydrogeologiske og geokemiske forhold, koncentrationen af forureningen og typen af afværagesystem (aktive eller passive). Som nævnt i afsnit 4.1 er aktive systemer med forceret gradient og evt. recirkulation de mest udbredte. Tabel 6.3 viser prisseksempler på nogle projekter med reduktiv deklorering, hvor pilotforsøg blev fuldført (der vises også omkostningerne for den efterfølgende fuldskalaetablering). Det er vanskeligt at finde publiceret information om sådanne omkostninger, da leverandører og de udøvende firmaer ofte ikke vil afsløre deres indtægter i forbindelse med projektet. Det kan dog nævnes, at i ethvert tilfælde vil et veldefineret recirkuleringsystem typisk koste mellem 150-250.000 US\$ (afhængig af de førnævnte faktorer).

Tabel 6.3. Prisseksempler for projekter med stimuleret reduktiv deklorering.

Lokalitet	Beskrivelse	Omkostninger		Referencer
		Pilotforsøg	Fuldskala etablering	
Houston Texas	Recirkulationssystem med metanol som elektrondonor		600.000 US\$ (etablering) + 100.000US\$ pr. år (drift)	U.S. EPA 2000
Dover Air Force Base, Area 6	Recirkulationssystem med bioaugmentation	285.000 US\$		U.S. EPA 2000
Lycoming Superfund Site	Daglig batch-injektion af melasse	145.000 US\$	220.000 US\$ (etablering) + 50.000US\$ pr. år (drift)	U.S. EPA 2000
Watertown, Massachusetts	Recirkulationssystem med laktat som elektrondonor	150.000 US\$		U.S. EPA 2000

### 6.2.5 Fuldskalaoprensning på en hypotetisk lokalitet

Fuldskalaoprensninger med stimuleret reduktiv deklorering er svære at prissætte, da de fleste af disse afværgeprojekter stadig er i drift. Det er desuden svært af konkurrencemæssige hensyn at få oplyst omkostningerne fra de udførende firmaer. Desuden er det svært at sammenligne teknologiernes omkostninger fra lokalitet til lokalitet, da disse varierer på grund af lokale faktorer. Quinton et al. (1997) and Harkness (2000) udgav en omkostningsanalyse for en hypotetisk lokalitet, der indeholdte en sammenligning af tre forskellige teknikker: (1) Forceret gradient og kontinuerlig tilsætning af substrat; (2) naturlig gradient og batch-tilsætning af substrat; og (3) passiv system med langsomt frigivende elektrondonor. Omkostningsanalysen, der er opsummeret nedenfor, sammenligner de enkelte enhedsomkostninger for hver teknologi. Harkness (2000) fremhæver, at analysen er ment som en fremhævnings af de relevante omkostningsmæssige elementer for hvert design, fremfor at udgøre en endelig økonomisk analyse.

Den hypotetiske lokalitet indeholdte en 300 m lang, 125 m bred og 18 meter dyb PCE forureningsfane med en gennemsnitlig koncentration af opløst PCE på 1 mg/l. Kilden til forureningsfanen var antaget værende 2725 kg PCE som residual fri fase i den umættede zone. Dybden til grundvandet var 6 meter og med et svagt permeabelt lerlag 25 m u.t. Den gennemsnitlige grundvandshastighed var 0,3 m/d og porøsiteten 0,25. Analysen antog, at kun kildeområdet (25 x 30 m) skulle behandles, og PCE indholdet i grundvandet udenfor kildeområdet ville undergå effektiv naturlig nedbrydning og overholde drikkevandskvalitetskriterierne udenfor matrikelgrænsen.

Tabel 6.4 opsummerer resultaterne af omkostningsanalysen for de tre teknologier, der blev evalueret. Omkostningerne er delt op i etableringsomkostninger (primært monitoringsboringer, injektion- og ekstraktionsboringer, beholdere og rørføringer), designomkostninger (inklusive monitoringsstudier og tracerforsøg), driftsomkostninger og lønomkostninger, monitoringsomkostninger og substratomkostninger. Den totale nettoomkostning for hver opdeling er vist, sammen med den procentvise fordeling. Som det ses af tabellen, havde det aktive system med kontinuerlig tilsætning en nettoomkostning på 1.300.000 US\$, sammenlignet med batch-systemets 840.000 US\$ og 900.000 US\$ for det passive system. Disse udgifter synes meget høje i forhold til danske forhold, men det skal tages med i betragtning, at der er tale om oprensning af et relativt stort volumen på ca. 13.000 m<sup>3</sup> (25 m x 30 m x 18 m). Det ses, at driftsomkostningerne er høje i alle tilfælde, især for systemet med kontinuerlig injektion, hvilket skyldes oftere rensning af boringer mv. for biofilm og udfældninger. Harkness (2000) fremhæver, at de estimerede lønomkostninger for det aktive system er overestimeret (estimeret til værende fuldtidsbeskæftigelse), da fjernbetjening af driften typisk er benyttet i dag.

Selvom analysen præsenteret i tabel 6.4 er et værdifuldt værktøj for forståelsen af de relative omkostninger, der hører med til hver del af systemet, mangler tabellen, at indentificere forskelle mellem de forskellige behandlingstider i de tre systemer, da det er antaget, at alle tre metoder opnår oprensningsmålet efter 5 år. Typisk opnår systemer med forceret gradient og kontinuerlig tilsætning stopkriterierne langt hurtigere end systemer med naturlig gradient (kapitel 5).



Tabel 6.4 Sammenligning af enhedsomkostninger for stimuleret reduktiv deklorerings på en hypotetisk lokalitet (Quinton et al. 1997; Harkness 2000; ITRC/RTDF 2003).

Enhedsomkostning	Nettoomkostning (10 <sup>3</sup> US\$)	% af total	Antagelser/omkostningsfaktor
Forceret gradient, kontinuerlig tilførsel			
Etablering	\$155	12%	Systemet drives i 5 år. Tilsætning af natrium benzoat (\$1,7/kg). Fire injektionsboringer og fire ekstraktionsboringer. Automatisk, kontinuerlig tilsætning af substrat. Driftsoperatør tilstede 50 timer/uge
Design	\$140	11%	
Drift/løn	\$745	57%	
Monitering	\$130	10%	
Substrat	\$130	10%	
Total	\$1300		
Naturlig hydraulisk gradient. Periodiske batch injektioner			
Etablering	\$100	12%	Systemet drives i 5 år. Tilsætning af natrium benzoat (\$1,7/kg). 10 injektionsboringer og ingen ekstraktion (naturlig gradient). To batch-tilsætninger af substrat pr. måned. To driftsoperatører tilstede 40 timer/måned.
Design	\$120	14%	
Drift/løn	\$360	43%	
Monitering	\$130	15%	
Substrat	\$130	15%	
Total	\$840		
Passiv langsomt frigivende system			
Etablering	\$50	2%	Systemet drives i 5 år. Langsomt frigivende substrat koster \$6,7/kg. 100 Direkte injektion. Reinjektion kræves to gange årligt. Den totale masse af tilsat elektrondonor er ækvivalent til de ovenfor nævnte kontinuerlig drift- og batch tilsætningssystemer. Ingen vedligeholdelse krævet
Design	\$120	14%	
Drift/løn	\$100	43%	
Monitering	\$130	15%	
Substrat	\$500	15%	
Total	\$900		

### 6.3 Erfaringer fra Holland

I Holland kan der udføres treatability studier for ca. 5000 - 6000 Euro (Ras N.; 2004). Dette omfatter afprøvning af en kulstofkilde og omfatter naturlig nedbrydning (dvs. uden tilsætning af substrat) og biostimulation (tilsætning af kulstofkilde). Skal der udføres test med tilsætning af bakterier vil det koste yderligere ca. 3000 Euro. Afprøvning af flere kulstofkilder vil øge udgifterne. Prisen inkluderer kort afrapportering, men er eksklusiv prøvetagning af sediment og vand.

I Holland udføres der også påvisning af *Dehalococcoides ethenogens*. En kvalitativ bestemmelse kan udføres for ca. 390 Euro og en kvantitativ bestemmelse kan udføres for ca. 455 Euro pr prøve (Ras N.; 2004). Priserne er eksklusiv prøvetagning, men dette kræver kun fremsendelse af vandprøver til Holland.

Udgifter til fuldskala oprensning i Holland er i appendiks G angivet fra 0,1 - 2 mill. Euro alt afhængig af mængden af jord, der skal oprenses. Det skal bemærkes, at disse priser er forventede udgifter, da kun 2 af de 25 nævnte projekter er afsluttede.

# 7 Sammenfatning af litteraturstudie

## 7.1 Indledning

I dette afsnit vurderes væsentlige forhold vedrørende *in situ* anvendelse af stimuleret reduktiv deklorering. I de foregående afsnit er vidensgrundlaget blevet gennemgået i detaljer, og det er åbenbart, at litteraturen på visse områder er meget righoldig, mens den på andre områder er mere sparsom og præget af en empirisk tilgang. Dette er typisk for afværgeteknologier, da traditionen har været, at procesmæssige forhold ofte er detaljeret belyst under velkontrollerede laboratorieforhold af forskere, mens afprøvningen under feltforhold er foretaget af rådgivende firmaer. I forbindelse med stimuleret anaerob deklorering er dette forhold under opblødning, da der findes en række eksempler i Nordamerika på frugtbare samarbejder, hvor konsortier af forskere, rådgiver og myndigheder har arbejdet med problemstillingen. Dette er en afspejling af, at problemstillingen er forholdsvis kompliceret, da den udover de traditionelle arbejdsområder (hydrogeologi, forureningskemi, dimensionering og implementering) omfatter et meget betydende mikrobiel og geokemisk element, især efter at bioaugmentation indgår som en del af teknologien. Detaillendskab til disse forhold er normalt ikke tilstede hos rådgivende firmaer, og da der samtidig er behov for en høj grad af forståelse for de praktiske sider (engineering), er vejen banet for nye samarbejdsformer.

## 7.2 Reduktiv anaerob deklorering

Den mest betydende biologiske fjernelsesmekanisme for de klorerede ethener under anaerobe forhold er reduktiv deklorering. Der sker en trinvis fjernelse (substitution med brint) af kloratomerne, så der fra PCE dannes TCE, *cis*-DCE, VC og til sidst ethen. Det er sandsynliggjort, at dehalorespiration, hvor de klorerede ethener indgår som elektronacceptorer, har størst betydning i forurenede grundvandssystemer. Ved halorespiration er der behov for adgang til elektrondonorer. Den mest betydende elektrondonor er brint, og derfor er koblingen til de terminale redoxprocesser (fx sulfatreduktion), fermentering og anaerob deklorering nøglen til at forstå reduktiv anaerob deklorering. På nuværende tidspunkt er de enkelte processer forholdsvis veldokumenterede, men især brints og eventuelle andre elektrondonorers rolle i dette samspil er kompleks.

Halorespiration finder sted under stærkt reducerede redoxforhold i grundvand. I laboratorieforsøg er det påvist at ske under jernreducerende, sulfatreducerende og metanogene forhold, men det er formentlig optimalt med et redoxniveau svarende til sulfatreduktion. Under feltforhold er redoxforholdene typisk dårligere belyst, men det er forholdsvis entydigt, at der også under redoxforhold fra jernreducerende til metanogene forhold kan ske anaerob deklorering. På mange lokaliteter vil der formentlig være flere forskellige redoxmiljøer indenfor korte afstande eller redoxprocesserne vil forløbe sideløbende. Det betyder, at selvom forholdene ikke er optimale for den anaerobe dekloreringsproces, så kan der forekomme anaerob deklorering i mikronicher, som resulterer i dannelse af lave koncentrationer af nedbrydningsprodukter.

Der er en række mikroorganismer, som kan medvirke til anaerob deklorering og få et energiudbytte ud af nedbrydningsprocessen. Blandt de PCE-deklorerende bakterier er der i dag kun isoleret en renkultur *Dehalococcoides ethenogens* 195, hvor det er dokumenteret, at der ved halorespiration kan ske nedbrydning af PCE eller TCE fuldstændigt til ethen. Det sidste trin i dekloreringsfølgen fra vinylklorid til ethen foregår formentlig ved cometabolisk transformation og er ikke kædet sammen med dehalorespiration (se dog diskussion i Major et al., 2003). *Dehalococcoides ethenogens* 195 tilhører bakteriestammen *Dehalococcoides*, som har den egenskab, at den kan foretage reduktiv deklorering fra *cis*-DCE til VC. I praksis er dette overordentlig vigtigt, da det betyder, at den anaerobe deklorering fra PCE til *cis*-DCE kun kan ses som første del af processen. Og forekomsten af *cis*-DCE i sig selv beviser ikke, at der kan ske fuldstændig nedbrydning til vinylklorid og ethen på en lokalitet.

I forhold til stimuleret anaerob deklorering har det åbnet for en interessant diskussion om perspektiverne. Har det noget formål at identificere de forekommende bakterier på en lokalitet? Vil forekomsten af *Dehalococcoides* være ensbetydende med, at anaerob deklorering til vinylklorid vil finde sted? Sandsynligvis ikke altid. Der skal være et konsortium af bakterier, og de skal være i kontakt med forureningen. Det kan være et problem, hvis de lever i anaerobe mikronicher med ringe vandudveksling. Desuden er alle *Dehalococcoides* ikke lige effektive til at omdanne TCE til *cis*-DCE eller VC til ethen. Samtidig skal der også dannes tilgængeligt brint, som kan anvendes i processen. Disse erkendelser ændrer heller ikke ved, at de grundlæggende processer foregår under anaerobe forhold. *Dehalococcoides* vil formentlig kun overleve i meget begrænset omfang i et aerobt miljø. Til gengæld er manglende tilstedeværelse af *Dehalococcoides* sandsynligvis ensbetydende med, at anaerob deklorering fra *cis*-DCE til VC ikke finder sted. Det kan derfor være interessant at screene lokaliteter med molekylær biologiske metoder for forekomsten af *Dehalococcoides*. Det har også rettet opmærksomheden mod dannelsen af vinylklorid og ethen på forureningslokaliteter, da det er et godt signal om, at miljøforholdene er de rette, og bakterierne er tilstede. I modsætning til lokaliteter, hvor der kun er observeret *cis*-DCE. Det skal bemærkes, at forekomsten af ethen, generelt også opfattes meget positivt, da det indikerer, at vinylklorid kan omdannes videre og dermed forhåbentlig ikke ophobes i systemet.

Den anden væsentlige diskussion er, om det er en fordel at tilsætte yderligere bakterier til et system, hvor der sker anaerob deklorering til ethen. Det kan der ikke svares entydigt på i dag, da der vides for lidt om bakteriernes evne til at vokse under feltforhold i forhold til eksisterende bakterier. Den eneste reference på området (Lendvay et al., 2003) indikerer, at det er en fordel i form af en hurtigere nedbrydning i et pilotprojekt. Dette kan være et meget vigtigt argument, da tidshorizonten i oprensningen måske kan mindskes.

Betydningen af miljøfaktorer som temperatur, næringssalte, inhiberende stoffer og koncentrationen af de klorerede opløsningsmidler er undersøgt under laboratorieforhold. Viden om disse forhold er dog begrænset, og især betydningen af temperatur er sparsom. Langt størstedelen af den etablerede viden er indsamlet ved temperaturer, som er højere end de danske grundvandstemperaturer. Det gør sig også gældende for de oplysninger, der kan findes om nedbrydningsrater i laboratoriet. Den nyeste litteratur fokuserer en del på mulighederne for at omsætte klorerede ethener, som er tilstede i høje koncentrationer (nær opløselighed) eller som frie faser. Disse resultater er lovende, men ikke konklusive på nuværende tidspunkt. Det er tilsvarende også

interessant at vide, hvor høje koncentrationerne skal være for at opretholde en effektiv nedbrydning af klorerede ethener. Er der en nedre tærskelværdi, hvor nedbrydningen ikke går i gang eller går i stå? Under feltforhold er betydningen af ovennævnte miljøfaktorer kun belyst i ringe grad og i de tilfælde, hvor der ikke sker anaerob deklorering, selvom bakterierne er tilstede, og redoxforholdene er de rette, skal forklaringen måske søges her.

### 7.3 Anvendelse af anaerob deklorering som afværge

Hovedparten af erfaringer med anaerob deklorering som afværgeteknologi i pilot- og fuldskala er opnået i Nordamerika. Der er også en del aktiviteter i Holland, men der er kun få publikationer herfra i den internationale litteratur. I Danmark er der kun et enkelt eksempel på felt erfaringer i form af et pilotforsøg. Det anses ikke for en barriere for implementering af teknologien i Danmark, da de generelle ingeniørmæssige aspekter omkring anaerob deklorering ikke adskiller sig væsentligt fra *in situ* kemisk oxidation eller air sparging.

*In situ* anaerob deklorering som afværgeteknologi har hovedsagelig været anvendt på sandede lokaliteter, og der er på det seneste sket en stærk udvikling i anvendelsen i opsprækkede bjergarter (kalk, granit). Vidensgrundlaget vedrørende oprensning i lavpermeable akviferer er ringe. De opnåede erfaringer tyder på, at man vil møde de samme problemer som med alle andre teknikker på sådanne lokaliteter dvs. problemer med tilførsel og opblanding (kontakt med forureningen), dyr og besværlig monitorering, og lange tidshorisonter.

I lavpermeable aflejringer findes der i dag ikke mange egnede *in situ* metoder. Oprensningsforsøg med stimuleret reduktiv deklorering i lavpermeable aflejringer viser, at det er muligt at stimulere den biologiske omsætning, herunder at fjerne en betydelig del af forureningsmassen - dog ses der ofte en væsentlig restforurening med nedbrydningsprodukterne *cis*-DCE og VC. Når der først er opnået de rette geokemiske og mikrobiologiske forhold i den mættede zone, er der eksempler på, at den biologiske omsætning vil fortsætte i flere år, selvom de tilsatte elektrondonorer er næsten opbrugte. Det sker bl.a. fordi den opformerede biomasse langsomt dør hen og giver næring til fortsat biologisk omsætning. På baggrund heraf vurderes det, at stimuleret reduktiv deklorering har et potentiale i lavpermeable aflejringer, hvor opholdstiden for de tilsatte donorer er stor. Mængden af elektrondonorer der skal tilsættes til disse aflejringer, vil som følge af den lange opholdstid også være relativ lille.

Der er et behov for at udvikle afværgeteknologien ved hjælp af pilotforsøg for at afklare, om det overhovedet er muligt at oprense lavpermeable aflejringer. Anvendelsen af forskellige injektionssystemer skal vurderes og potentialet i at anvende fx frakturering. Det kan være hensigtsmæssigt at gennemføre laboratorieforsøg for at opnå en bedre procesforståelse (fx forsøg med anaerob deklorering i uforstyrrede lerkerner).

Potentialet for at stimulere nedbrydning af frie faser eller på grænsefladen mellem frie faser og forureningsfanen er ud fra laboratorieforsøg tilsyneladende til stede. Dette forhold er et væsentligt forskningsområde og undersøges i øjeblikket i felten i Nordamerika i pilotforsøg. Anvendelsen i den umættede zone er et andet relevant udviklingsområde, hvor en udvikling ville være hensigtsmæssig. Mange forureninger under bygninger henligger i både

mættet og umættet zone, så det ville være optimalt, om metoden kunne anvendes i begge områder.

Vurdering af erfaringerne med aktive og passive injektionssystemer lider under, at de data, der er indsamlet for passive systemer, er af begrænset kvalitet. På det nuværende grundlag fremstår aktive systemer som overlegne i forhold til passive systemer. I den sammenhæng er det formentlig vigtigere at vurdere de konkrete hydrogeologiske forhold, før der træffes valg omkring injektionssystemer.

Det vurderes i lighed med andre *in situ* metoder vanskeligt at opnå en fuldstændig oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering. I udlandet er det kun lykkedes i ganske få sager at opnå oprensning til drikkevandskravene. Det vurderes, at udgifterne til en fuldstændig oprensning til drikkevandskravene vil være relativt store - og måske kun attraktivt på relativt få lokaliteter i Danmark.

Derimod vurderes det, at der er større potentiale i at anvende metoden til nedbringelse af forureningsmassen. I Danmark er der et stigende behov for implementering af oprensningsmetoder, der kan tage hånd om dybereliggende forurening eller forurening under bygninger - hvor det ikke er muligt at fjerne forureningen ved opgravning inden for en rimelig beløbsramme.

#### 7.4 Stimulering med elektrondonor og bakterier

Konkrete eksempler, hvor der er anvendt bioaugmentation som en del af teknologien, begrænser sig næsten udelukkende til Nordamerika (dog én sag i Holland - Henssen et al., 2001). Dette forhold betyder, at der i forbindelse med implementering af afværgeteknologien er et behov for at overføre konkrete amerikanske erfaringer med håndtering og tilsætning af bakterier til danske forhold. Det skal bemærkes, at der i dag ikke sælges bakterier af europæiske firmaer. Et hollandsk firma sælger dog et samlet on-site oprensningskoncept med bioaugmentation. Der ses dog ikke noget praktisk problem i at anvende bakteriekulturer, som er opformeret i Nordamerika, hvis bakterierne opfylder de danske myndigheders krav.

Det kan diskuteres, om det er hensigtsmæssigt at opformere en bakteriekultur fra en dansk forureningslokalitet, hvor der sker anaerob deklorering. Fordelene kunne være, at en sådan kultur er tilvænnet danske akviferforhold og grundvandstemperaturer. Man ville også undgå en diskussion af, hvorvidt der indføres fremmed genetisk materiale i form af bakteriekulturer til Danmark. Ulemperne er at omkostningerne til udvikling og kontrol af en effektiv bakteriekultur vil være meget store i forhold til et forholdsvist lille dansk marked. Der kan dog være en mulighed for en bredere europæisk anvendelse, som kan berettige udviklingsomkostningerne.

Et vigtigt led i anvendelsen af anaerob deklorering som afværge er at vurdere potentialet for processen på en lokalitet. Det vurderes, at procesforståelsen er så god, at en kombination af hydrogeologisk information, forureningskemisk, geokemisk og mikrobiologisk viden med stor sikkerhed vil kunne afklare dette forhold. Det er en forudsætning, at der er udført en grundig karakterisering som også belyser fx geologiske variationer i form af sprækker og sandlinser i moræneler. En bedre bestemmelse af den hydrauliske ledningsevne er ofte påkrævet - især i aflejringer af eksempelvis moræneler med sandindslag er der

ofte ingen oplysninger om den hydrauliske ledningsevne eller variationen heraf.

I forhold til de nuværende danske undersøgelser er der i fremtiden behov for at måle ethen og ethan som standard, mens analyser for klorerede ethener og relevante nedbrydningsprodukter gennemføres standardmæssigt i Danmark. Det er også formålstjenligt at udvide og i nogle tilfælde stramme op på procedurerne for prøvetagning og analyse for redoxparametre, så de afspejler de reelle forhold på lokaliteten. Tabel 8.1 giver et godt overblik over parametre, som er hensigtsmæssige at medtage, når potentialet for anaerob reduktiv deklorering skal vurderes.

I forbindelse med fortolkning er anvendelse af molære koncentrationer og beregning af stofratioer (PCE/TCE, TCE/*cis*-DCE, *cis*-DCE/VC) en god ide. Det er også vigtigt kritisk at vurdere sammenhængen mellem de aktuelle redoxforhold og den observerede anaerobe deklorering.

Når der er identificeret et behov for tilførsel af elektron donor er det væsentligt at vælge den bedst egnede elektron donor i forhold til at få en effektiv dekloreringsproces, men også i forhold til fysiske og hydrogeologiske forhold. På baggrund af laboratorie- og felterfaringer i litteraturen er det meget vanskeligt at træffe et entydigt valg, da mange elektron donorer har vist sig at være velegnede. Der eksisterer en del konkret viden om hvilke elektron donorer, som er velegnede i forbindelse med forskellige injektionssystemer (aktive/passive). Desværre er litteraturen præget af, at mange feltanvendelser ikke er understøttet af gode monitoringsprogrammer, så den reelle effektivitet af donorer under feltforhold ikke er belyst (Nyer et al., 2003; Major et al., 2003). Det gør sig især gældende for komplekse donorer, der frigøres langsomt over tid.

For at sikre et procesmæssigt optimalt donorvalg foreslås det derfor, at der med det nuværende erfaringsgrundlag gennemføres laboratorieforsøg med donorer, som er potentielle kandidater på den givne lokalitet. Der eksisterer ikke i dag kommercielle laboratorier i Danmark, der tilbyder sådanne forsøg. Disse forsøg kan også belyse donorforbruget på den givne lokalitet. Sådanne vurderinger af donorforbruget skal altid sammenholdes med data om grundvandskemien fra lokaliteten og den valgte injektionsmetode. Den største usikkerhed omkring behovet for elektron donor er knyttet til mængden af biologisk tilgængeligt jern. Der er i litteraturen meget lidt fokus på den problemstilling, men samtidig er der i mange feltafprøvninger rapporteret om høje koncentrationer af opløst jern. Der er behov for at sammenholde donorforbrug fra teoretiske beregninger, forbrug i laboratorieforsøg og forbrug under feltforhold for at optimere donortilsætning under danske forhold. Uanset om jern har signifikant betydning som elektron acceptor, er det værd at bemærke, at det samlede elektron donor behov typisk er betydeligt lavere end de mængder af kemiske oxidationsmidler, som tilsættes ved fx kemisk oxidation.

Laboratorieforsøgene skal samtidig belyse behovet for bioaugmentation. Det har i litteraturen været fremført, at molekylærbiologiske metoder kunne erstatte eller supplere laboratorietest, da molekylærbiologiske metoder måske entydigt kan afklare, om *Dehalococcoides* er tilstede på en lokalitet. Det vurderes, at disse metoder på nuværende tidspunkt ikke er et alternativ til laboratorietest, da de molekylærbiologiske undersøgelser ikke afklarer valget af donor, herunder problemer eller tidshorizonten i etablering af de rette redoxforhold. Desuden er der som tidligere diskuteret ikke en entydig

fortolkning af sammenhængen mellem forekomsten af *Dehalococcoides* og anaerob deklorering. I litteraturen er der en livlig diskussion af behovet for bioaugmentation. Dette drejer sig primært om, hvorvidt det er redoxmiljøet eller specifikke bakterier, der fører til en effektiv anaerob reduktiv deklorering (Nyer et al., 2003; Major et al., 2003). Sandsynligvis er det en kombination, da de rette bakterier ikke kan formere sig i det forkerte miljø. I den diskussion skal det medtages, at selvom processen foregår i laboratoriet og i felten, er det også et spørgsmål om hastigheden, hvormed den foregår. Hvis tilførsel af bakterier kan forøge hastigheden flere gange, kan det på trods af de ekstra omkostninger måske være en bedre løsning at tilsætte bakterier end at basere sig på den eksisterende bakteriemasse.

#### 7.5 Økonomi, myndighedsbehandling og afslutning af sager

Udgifterne til de gennemførte oprensninger i Nordamerika spænder fra få hundrede tusinder til mange millioner for de enkelte grunde. Oprensningsgraden og størrelsen af indsatsområdet er styrende for økonomien. Der er forskellige elementer i et typisk afværgeprojekt med anaerob deklorering: Feltundersøgelser, treatabilitytest, pilotskalaforsøg og fuldskalaoprensninger.

Omkostninger til feltundersøgelser vil selvfølgelig variere efter kompleksiteten. Merudgifterne til feltundersøgelserne til at belyse om en lokalitet er egnet til stimuleret reduktiv deklorering er relativt lille, under forudsætning at der i forvejen udføres undersøgelser af forureningsudbredelsen og af de hydrogeologiske forhold. De ekstra undersøgelser der typisk skal udføres er undersøgelse af redoxforholdene (boringskontrol), analyse for ethen/ethen og indholdet af organisk stof i sedimentet. Disse undersøgelser kan udføres for under 20.000 kr, under forudsætning af, at de udføres samtidig med de andre undersøgelser på lokaliteten.

Treatabilityforsøg koster i størrelsesordenen 75.000 - 200.000 kr afhængig af antallet af flaskeforsøg. Pilotforsøg kan afhængig af kompleksitet (bl.a. passiv/aktiv system, boringsdybde, valg af elektrondonor, monitoringsprogram) udføres for få hundrede tusinde til ca. 1 mill. kr.

De billigste fuldskala oprensninger opnås ved passive systemer, hvor målet er en massereduktion af forureningen og ikke en fuldstændig oprensning. Dette kan gøres relativt simpelt ved at injicere langsomtfrigivende elektrondonorer i borerer etableret ved hjælp af fx Geoprobe. Udgifterne hertil (uden forudgående treatability test) kan gøres for under ½ million kr. afhængig af monitoringsprogrammet. Der kan dog ikke forventes en fuldstændig oprensning. Udgifterne til elektrondonorer og evt. bakteriekultur vil typisk kun udgøre 10-20 % af de samlede udgifter.

De samlede udgifter til aktive systemer kommer nemt over 1 mill. kr afhængig af oprensningsmål, størrelse af indsatsområde og driftstid. Igen udgør elektrondonorer og evt. tilsætning af bakterier kun omkring 10-20 % af udgifterne. I forhold til passive systemer vil oprensningseffekten med de gældende erfaringer være bedre.

I forhold til andre oprensningsmetoder som airsparging og afværgepumpning vurderes stimuleret reduktiv deklorering at være konkurrencedygtig. Det vil dog afhænge af en konkret vurdering på den enkelte sag.

Miljøstyrelsen har udviklet en administrativ praksis for tilladelse til injektion af bakterier til grundvandsmagasiner på baggrund af et forskningsprojekt ved Avedøre. Denne praksis bør formidles og koordineres med amternes procedurer, som er meget forskellige fra amt til amt. Det ville være hensigtsmæssigt at hele sagsbehandlingsforløbet blev beskrevet og formidlet, så sagsgangen for fremtidige ansøgninger bliver ens og simple for både ansøgere og myndigheder.

Tilsætning af elektrondonor skal godkendes af den amtslige myndighed, og der er givet en enkelt tilladelse i Danmark. Der er ikke nogen klar administrativ praksis i amterne på dette område, hvilket kunne være hensigtsmæssigt i forhold til sagsgangen ved fremtidige ansøgninger.

Der er i litteraturen påpeget en række aspekter omkring risiko ved injektion af elektrondonorer, som primært er knyttet til dannelsen af vinylklorid og de afledte redoxprocesser (metanproduktion, sulfid, opløste metaller). Disse forhold skal selvfølgelig vurderes seriøst ikke mindst i forhold til oprensninger i boligområder, men det vurderes ikke, at risikoen ved disse aspekter adskiller sig markant for risikoen ved andre afværgeteknologier fx kemisk oxidation.

Risikoen ved injektion af bakterier anses for at være ubetydelig, hvis de procedurer, der er udviklet i USA, overholdes. Umiddelbart er det største problem risikoen for injektion af patogene mikroorganismer, hvilket skal sikres ved attester på, at bakteriekulturterne er testet og fundet fri for patogener. Det skal understreges, at de kendte bioaugmentation teknikker benytter sig af bakterier, som er opformeret på baggrund af naturligt forekommende bakterier. Der er altså ikke tale om genetisk manipulerede bakterier (GMO).

Et hyppigt spørgsmål er muligheden for spredning og overlevelse af de injicerede bakterier. Bakterierne kan transporteres i akviferer, hvilket nærmest er en forudsætning for, at de kan anvendes til bioaugmentation. Spredningshastigheden er formentlig langsommere end den naturlige grundvandstrømningshastighed (Major et al., 2002; Cox et al., 2002). *Dehalococcoides*'s overlevelse i akviferer er ikke velundersøgt. Det forventes ikke, at der sker en stærk vækst af bakterierne udenfor områder forurenet med klorerede opløsningsmidler. Kulturen henfalder eller dør formentlig under aerobe forhold, men vidensniveauet er meget sparsomt.

I litteraturen er der få rapporter om afsluttede sager, tidshorisonter og oprensningsniveauer. Vidensgrundlaget er så sparsomt, at en konkret vurdering af disse forhold ikke har været muligt. Det er dog meget sandsynligt, at tidsforløbene med de nuværende teknologier vil være flere år, så der er ikke tale om en revolution i effektiviteten af oprensning af klorerede opløsningsmidler. Samtidig skal det med i billedet, at de danske krav til oprensningsniveauer vil være anderledes end de amerikanske, så tidshorisonten og oprensningsniveau skal vurderes samlet. Det rejser et behov for, at de første sager i Danmark, hvor anaerob deklorering anvendes som afværgeteknologi, følges tæt. Det indebærer bl.a. veldokumenterede monitoringsprogrammer og klare krav til vurdering af oprensningsgrad.

## 7.6 Udviklingsbehov

I tabel 7.1 er der samlet en række af de behov for udvikling af anaerob deklorering som afværgeteknologi på feltskala, der er identificeret i dette



kapitel. Der er fokuseret på emner, som har bred relevans for rådgivere og myndigheder.

Der foregår i øjeblikket også intens udvikling på forskningssiden indenfor det mikrobielle område. De emner, som har særlig interesse, er udvikling, anvendelse og fortolkning af molekylærbiologiske metoder i forhold til specifikke bakteriestammer, som kan foretage reduktiv anaerob deklorering. Desuden er der stor interesse for at forbedre procesforståelsen med hensyn til forholdet mellem elektrondonorer, elektronacceptorer og bakterier. Begge områder vil på sigt kunne føre til bedre muligheder for at designe effektive afværgeforanstaltninger.

Tabel 7.1. Udviklingsbehov for implementering af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering i Danmark

Emne	Problemstilling	Behov	Involverede
Pilot- og fuldskala erfaringer med anaerob deklorering	Meget begrænsede danske erfaringer med design og dimensionering	Veldokumenterede pilotforsøg, og fuldskala implementering, hvorunder valg og forbrug af af donor vurderes.	Danske rådgivere, forskere og myndigheder, evt. nordamerikanske rådgivere
Oprensning på lav permeable lokaliteter eller i umættet zone	Meget begrænsede internationale erfaringer	Pilotforsøg, evt. understøttet af laboratorieforsøg for at belyse processer	Danske rådgivere, forskere og myndigheder, evt. nordamerikanske rådgivere
Oprensning af frie faser eller på grænsefladen mellem frie faser og forureningsfanen	Der er laboratorieerfaringer, som påviser nedbrydning af meget høje koncentrationer af opløsningsmidler, men det er ikke tilstrækkeligt belyst under hverken laboratorie eller feltforhold	Forskning i anaerob deklorering af frie faser. Pilotprojekter med oprensning af frie faser eller oprensning på grænsefladen mellem frie faser og forureningsfanen	Forskere, og rådgivere (nationalt og internationalt)
Driftserfaringer	Tilklogning er anført som et problem i mange oprensninger	Sikre at de eksisterende udenlandske erfaringer for at forebygge og mindske klogning benyttes, herunder overveje hvilke metoder der er acceptable under danske forhold	Udenlandske rådgivere, danske rådgivere
Håndtering og injektion af bakterier	Ingen danske erfaringer	Overføring af konkrete erfaringer fra udlandet (Holland, Nordamerika)	Udenlandske rådgivere, danske rådgivere
Laboratorietest (treatabilitytest)	Få erfaringer med danske akvifermaterialer og grundvandstemperaturer	Udvikling af laboratoriemetoder til vurdering af anaerob deklorerings- potentiale, og nedbrydningsrater. Forsøgene skal også belyse valg af donor og donorbehov, herunder betydningen af jernhydroxider	Danske forskere, rådgivere og myndigheder, evt. danske og nordamerikanske laboratorier
Behov for bioaugmentation	Metoder til at vurdere behovet for bioaugmentation	Opsamling af erfaringer fra veldokumenterede igangværende og fremtidige oprensninger	Forskere, og rådgivere (nationalt og internationalt)
Myndighedsgodkendelse af injektion af donor og bioaugmentation	Uklar holdning til injektion af donor og tilsætning af bakterier til grundvand i Danmark	Afklaring af myndighedsforhold, herunder udvikling og formidling af procedurer for sagsbehandling.	Myndigheder (amter, Miljøstyrelse)
Monitering	Spredning af bakterier.	Det skal vurderes om der udover den traditionelle monitering er behov for monitering af spredning af bakterier efter injektion.	Myndigheder (amter, Miljøstyrelse)
Vurdering af oprensningstider	Der er få tilgængelige data fra afsluttede sager	Indsamling af kvalitetsdata i Danmark forbindelse med anaerob deklorering i fuld skala	Rådgivere og myndigheder

# 8 Screening af lokaliteter

Dette afsnit giver forslag til en screeningsmodel til en indledende vurdering af oprensning med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på en given lokalitet. Modellen er i første omgang udviklet til at screene 13 lokaliteter på Fyn, som alle er forurenede med klorerede opløsningsmidler.

Det er hensigten, at modellen efterfølgende skal kunne anvendes som et generelt redskab til at screene lokaliteter i Danmark. Indtil videre skal modellen dog kun anvendes som et relativt værktøj. Det vil sige til at udvælge de bedst egnede lokaliteter ud fra en sammenstilling af flere lokaliteter. Det er endnu for tidligt at opstille generelle retningslinier, for hvor høj score der skal til for, at stimuleret *in situ* reduktiv deklorering kan anbefales på en konkret lokalitet.

## 8.1 Forslag til screeningsmodel

Tabel 8.1 viser forslag til screeningsmodel. Modellen præsenterer en liste af kriterier til at vurdere anvendeligheden, og den tillægger en numerisk vægtning eller score for hvert kriterium. Som vist i tabellen er kriterierne organiseret i fire generelle kategorier:

- Forundersøgelser af lokaliteten og hydrogeologisk profil
- Forureningsprofil
- Geokemisk profil
- Logistiske faktorer

Kriterierne er vægtet i forhold til deres relevans. Kriterier, der sandsynliggør muligheden for brug af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering, er vægtet positivt, og kriterier, der reducerer muligheden er vægtet negativt. Derudover er kriterier, der minimerer omkostningerne ved implementeringen vægtet positivt. Hvis ikke der er data, vægtes punktet ikke (0 score).

Tabel 8.1 indeholder også en kort beskrivelse af relevansen og/eller betydningen af hvert kriterium. Efter gennemgang af alle data for en given lokalitet, opsummeres scoren for alle lokaliteter og metodens anvendelighed kan vurderes. Opbygningen af screeningsmodellen er inspireret af vejledningen udviklet af Morse et al. (1998). Der er gennemført en række ændringer for at tilpasse modellen til den nye viden på området og for at gøre modellen relevant for danske forhold. Modellen og dens opbygning er forklaret og diskuteret i det følgende.

Resultaterne, som genereres af modellen tjener kun som en indikation på muligheden for stimuleringen af den reduktive deklorering, og skal derfor ikke benyttes som erstatning for undersøgelser af anvendeligheden i felten. Modellen antager, at moderprodukterne kun er PCE eller TCE, og at det kun er de nyeste data der benyttes. Derudover vil forskellige områder af forureningsfanen have forskellige forureningsmæssige, geokemiske og

hydrogeologiske profiler, og derfor kan potentialet for at anvende stimuleret *in situ* reduktiv deklorering variere. Det anbefales derfor, at det er de gennemsnitlige eller mest almindelige forhold inden for forureningsfanen, som benyttes i modellen. Alternativt kan det være hensigtsmæssigt at anvende modellen på separate dele af det forurenede område (kilde og fane). Modellen er også udviklet til at udvælge lokaliteter, hvor den anaerobe deklorering forventes at vil foregå hurtigst.

Det skal bemærkes, at selvom modellen er udviklet til at udvælge lokaliteter, hvor den anaerobe deklorering vil foregå hurtigst, kan stimuleret anaerob deklorering også anvendes på lokaliteter med fx residual fri fase, men tidshorizonten for oprensningen bliver dermed længere end for lokaliteter uden fri fase (Battelle, 2004).

I det følgende diskuteres de forskellige kriterier, med fokus på brug af modellen til sammenligning af metodens anvendelighed blandt flere lokaliteter.

## 8.2 Kriterier for screeningsmodellen

### 8.2.1 Forundersøgelser og hydrogeologisk profil

Screeningsmodellen er af størst værdi for lokaliteter med omfattende datamateriale fra forundersøgelser. Modellen kan dog anvendes på lokaliteter, hvor datagrundlaget er minimalt, men dette resulterer i en lav score i den hydrogeologiske profil. Er forureningen afgrænset i tre dimensioner, vil dette kriterium opnå en høj score, og yderligere forundersøgelser er dermed ikke nødvendig før igangsættelse af treatability studier og evt. efterfølgende afværge. Etablering af *in situ* afværge er normalt også betydeligt dyrere på lokaliteter, hvor der ikke foreligger omfattende forundersøgelser.

Modellen giver en høj score for lokaliteter, hvor forureningsfanen ikke er beliggende så dybt, da det ofte ikke er økonomisk fordelagtigt at oprense i stor dybde (det samme er dog også gældende for andre oprensningemetoder). Ligeledes gives høj score for smalle faner, da meget vidtstrakte faner i nogle tilfælde vil være karakteriseret ved forholdsvis lave koncentrationer. En oprensning vil derfor være meget dyr, og den fjernede forureningsmasse vil være lille.

Tabel 8.1 Screeningsmodel

	Parameter	Screeningsværdi	Vægt-nlng	Forklaring	Opnåede point
<b>Forundersøgelse og hydrogeologisk profil</b>					
Afgrensning af forureningsfane	3-D		5	Fuldstændig afgrænset forureningsfane begrænser yderligere undersøgelser	
	2-D (horisontal)		2	Kendskab til horisontale spredningsveje. Nødvendig med vertikal afgræsning	
Dybde af forureningsfane	< 10 m		3	Dybden af fanen vil øge omkostningerne. Lokalteter med kort afstand til grundvandet foretrakkes	
	< 20 m		2		
	< 30 m		1		
Bredde af forureningsfane	< 50 m		5	Brede faner øger omkostningerne. Smalle faner foretrakkes	
	< 75 m		4		
	< 100 m		3		
	< 200 m		2		
Hydraulisk ledningsevne	< 300 m		1	Lokaliteter med høj permeabilitet gør tilsætning og spredning af substrat nemmere	
	$> 10^{-5}$ m/s		20		
	$10^{-6}$ m/s		10		
	$10^{-7}$ m/s		0		
	$10^{-8}$ m/s		-10		
Indhold af organisk kulstof i sediment	< 0.01%		2	Lavt indhold af organisk kulstof minimerer behovet for behandling af den sorberede fase	
	> 1%		-5	Højt indhold af organisk kulstof giver høj sorption og komplicerer vurderingen af testresultater.	
<b>Forureningsprofil</b>					
Sameksisterende forurening med oliekomponenter	> 0.1, men < 5 mg/L		2	Eksisterende elektrondonor er tilstede og støtter opretholdelsen af anaerobe forhold	
	> 10 mg/L		-5	LNAPL kan være tilstede, hvilket kan interferere med pilottesten	
Sameksisterende CM og TeCM	> 1 mg/L		-5	kloroform og klormetan hæmmer reduktiv deklorerings af klorethener	
Nedbrydningsprodukter af PCE og TCE	Ethen		20	<i>Dehalococcoides</i> sandsynligvis tilstede. Gunstig med fuldstændig nedbrydning.	
	VC		10	<i>Dehalococcoides</i> sandsynligvis tilstede	
	cDCE		5	Tydelig dekloreringsaktivitet	
	Ingen nedbrydningsprodukter		-5	Eksisterende forhold indikerer ingen dekloreringsaktivitet	
Total koncentration af klorethener	0.5 - 10 mg/L		5	Koncentrationsniveau tilstrækkeligt til at påvise effektiv behandling	
	> 100 mg/L		-5	Koncentrationer indikerer tilstedeværelse af fri fase DNAPL: kan interferere med fortolkningen af data fra pilottest.	
<b>Geokemisk profil</b>					
Opløst ilt	< 0.5 mg/L		3	Eksisterende forhold gunstige for reduktiv deklorering	
	> 3.0 mg/L		-3	Eksisterende forhold er hæmmende for reduktiv deklorering	
Nitrat	< 1 mg/L		3	Eksisterende forhold gunstige for reduktiv deklorering	
	> 5 mg/L		-3	Eksisterende forhold er hæmmende for reduktiv deklorering	
Sulfat	< 50 mg/L		3	Minimal mulighed for at sulfat fungerer som konkurrerende elektronacceptor	
	> 250 mg/L		-3	Sulfat udgør et potentiale for at forsinke eller forstyrre den reduktive deklorering	
Opløst jern, Fe(II)	> 1 mg/L		1	Eksisterende forhold gunstige for reduktiv deklorering	
Metan	> 0.1 mg/L		3	Eksisterende forhold gunstige for reduktiv deklorering	
Redoxpotentiale	< -200 mV		2	Eksisterende forhold stærkt gunstige for reduktiv deklorering	
	-200 to 0 mV		1		
	0 to 200 mV		-1		
	> 200 mV		-2		
Opløst organisk stof (NVOG)	> 20 mg/L		3	Betydeligt eksisterende forsyning af organiske elektrondonorer	
	5 - 20 mg/L		1	Eksisterende forsyning af elektron donorer	
	< 5 mg/L		0	Begrænset mængde af elektrondonorer tilstede	
pH	6.5-7.5		3	Optimalt pH	
	5.0-6.0 eller 8.0-9.0		-1	Gunstige forhold for vækst af bakteriekulturer i akviferen, dog med langsom vækstrate	
	< 5.0 or > 9.0		-5	Forholdene hæmmer vækst af bakteriekulturer i akviferen	
Hydrogenkarbonat (alkalinitet)	> 100 mg/L		1	Bufferkapacitet er gunstig	
	< 25 mg/L		-1	Ubetydelig bufferkapacitet	
Ledningsevne	Brakvand (50% havvand)		-10	Usædvanlig stor ionstyrke kan hæmme bakteriel forering	
<b>Logistiske faktorer</b>					
Adgang til lokalitet	Begrænset		-3	Sikkerhedsbevogtede lokaliteter eller begrænset adgang giver dårlige arbejdsforhold. Full adgang for projektets medarbejdere foretrakkes	
Tekniker, lokal eller på lokaliteten	Tilgængeligt		5	Lokal assistance (evt. på lokaliteten) foretrakkes for at reducere driftsomkostninger	
Eksisterende pump & treat afværgeanlæg	Eksisterende		5	Eksisterende rørføringer og borerer kan genbruges	
Elektricitet, vand og sanitet	Tilgængeligt		5	Tilgængeligt vand, elektricitet og sanitetsfaciliteter øger designmulighederne og kan reducere omkostninger	
Afstand til bygninger	Boligbebyggelse over eller nær behandlingszone		-5	Stimuleret reduktiv deklorering kan potentielt danne metan og vinylklorid. Ved anvendelse af metoden tæt på bebyggelse, skal man være opmærksom på risiko for påvirkning af indeklimaet	
Risiko for påvirkning af drikkevandsboringer eller recipienter ved behandlingen	Drikkevandsboringer eller recipienter tæt på behandlingsområdet		-5	Stimuleret deklorering kan påvirke grundvandskvaliteten; behandling tæt på drikkevandsboringer eller recipienter bør undgås	
<b>Score</b>					

Spredning og kontrol af tilsætningsstofferne (substrat og evt. bakteriekulturer) gennem behandlingsområdet er måske den mest betydende faktor for succesfuld oprensning. I overensstemmelse hermed giver modellen en høj score for lokaliteter, hvor akviferens ledningsevne letter hydraulisk kontrol og spredning af substrater/donorer. Lokaliteter med en hydraulisk ledningsevne mindre end eller lig med  $10^{-8}$  m/sek. giver en negativ score. Da størrelsen af hydrogeologiske parametre ofte er baseret på en vurdering (og er stærkt variable) er den hydrauliske ledningsevne det eneste benyttede kriterium for bedømmelse af en lokalitets hydrogeologiske forhold. Heterogeniteten i de geologiske forhold er ikke tildelt en score, men bør indgå i en samlet vurdering af lokaliteten og tages i betragtning inden en evt. etablering af afværge.

Som vist i tabel 8.1, favoriserer modellen lokaliteter med lavt indhold af organisk kulstof. Lokaliteter med et højt indhold af organisk kulstof (>1%) er u hensigtsmæssige for stimuleret *in situ* reduktiv deklorering, da en stor del af de klorerede opløsningsmidler vil være bundet dertil. Den biologiske nedbrydning foregår formentlig i vandfasen, og nedbrydning af sorberet forurening foregår først, når forureningen er overført til vandfasen ved desorption.

### 8.2.2 Forureningsprofil

Type og koncentration af forureninger på lokaliteten er nøgelfaktorer mht. metodens anvendelse. Produktion af ethen er sammen med den hydrauliske ledningsevne, den bedste forudsætning for succesfuld etablering af afværge med stimuleret reduktiv deklorering. Tilstedeværelsen af ethen giver en kraftig indikation på, at der er stærkt reducerende forhold, og at nedbrydningen ikke resulterer i ophobning af vinylklorid. Forekomsten af ethen og vinylklorid i betydende koncentrationer indikerer ligeledes, at *Dehalococcoides* er naturligt tilstede på lokaliteten. Derfor giver påvisning af betydelige koncentrationer af ethen en høj score. I praksis giver det et problem under danske forhold, da ethen sjældent bliver målt ved almindelige forureningsundersøgelser. Såfremt kun VC er påvist i betydelige koncentrationer, er det også en indikator for, at *Dehalococcoides* og de rette redoxforhold er tilstede. Der opnås ikke så høj en score, da VC er toksisk og høje koncentrationer kan tyde på, at VC ophobes. Modellen giver en negativ score for lokaliteter, hvor der ikke er påvist nedbrydningsprodukter, da fraværet af *cis*-DCE (eller TCE for lokaliteter forurenede med PCE) indikerer, at de rette redoxforhold ikke er til stede for anaerob deklorering.

Modellen fratrækker points for lokaliteter, hvor der er betydelige koncentrationer af tetraklormetan og kloroform eller forekommer residual fri fase. Tetraklormetan og kloroform i betydelige koncentrationer er kendt for at begrænse nedbrydningsraten for deklorering af klorerede ethener (se afsnit 3.6.4). Som nævnt i afsnit 3.9 kan klorerede ethener nedbrydes i overgangsfasen mellem den frie fase og vandfasen og derved øge opløsningsraten. Tilstedeværelsen af fri fase kan dog komplicere vurderingen af resultaterne af kortvarige pilotforsøg på grund af den kontinuerte opløsning af forureningen.

Modellen fratrækker på samme måde point, hvis der er fri fase af kulbrinter tilstede (LNAPL), da klorerede forbindelser kan opløses i denne fase, og dermed give anledning til en langsom, kontinuert frigivelse til vandfasen. Derimod tillægges der point, hvis der er lave opløste koncentrationer af olieforbindelser, da disse er med til at skabe reducerede redoxforhold ved at fungere som elektrondonorer.

### 8.2.3 Geokemisk profil

Generelt giver modellen point for lokaliteter, hvor der er reducerede redoxforhold (fx negativt redoxpotentiale, lave indhold af ilt og nitrat, tilstedeværelse af jern(II) og methan), der giver gunstige forhold for reaktiv deklorering. På samme måde fratrækkes point ved oxiderede forhold. Modellen begunstiger lokaliteter med neutrale pH forhold (6-8) og trækker point fra ved det modsatte (pH<5 og pH>9) samt ved høje sulfatkoncentrationer (> 250 mg/L).

Brint er ikke medtaget, da den normalt ikke måles ved danske forureningsundersøgelser. Tolkning af brintdata kan endvidere være vanskelig i forhold til at vurdere redoxforhold.

For høj ionstyrke (med saltvand) er ikke favorabel for bakterievæksten. Modellen giver derfor en negativ score for lokaliteter med højt saltindhold i grundvandet (> 1.5 % NaCl). Disse forhold er dog sandsynligvis ikke særlig relevante på danske lokaliteter, da der primært oprenses i magasiner med lavt saltindhold.

### 8.2.4 Logistiske faktorer

Tilgængeligheden af forskellige logistiske faktorer har betydning for etablerings- og driftsomkostningerne. Faktorer som let adgang til elektricitet, vand eller en lokal tekniker, som kan udføre vedligeholdelse og prøveudtagning, giver point i modellen. Lokaliteter, hvor der foregår afværgepumpning og behandling er gunstige, da der allerede er etableret infrastruktur (pumper, rørføringer og elektricitet), som kan benyttes til den nye afværgete metode.

Screeningsmodellen fratrækker point for lokaliteter med tæt bebyggelse (boligområder, parcelhuse), eller hvor forureningen er placeret under bygninger. Dette giver svære arbejdsforhold, som kan påvirke driften og monitoringen af systemet. I terrænnære grundvandsmagasiner kan risikoen for ophobning af metangas (og vinylklorid) under bygninger udgøre et potentielt problem for både indeklima og sikkerheden (metangas).

Der fratrækkes også point, hvis behandlingsområdet er beliggende tæt på recipienter eller drikkevandsindvindingsområder. Det reducerede grundvand kan både udgøre en negativ påvirkning af recipienter (iltforbrug) og give ubehagelige lugtgener på grund af sulfid. Desuden kan dannelsen af vinylklorid udgøre en risiko for både recipienter og menneskers sundhed.

## 8.3 Valg af lokaliteter

### 8.3.1 Præsentation af lokaliteter som indgår i screeningen

De 13 udvalgte lokaliteter som indgår i screeningen fremgår af tabel 8.2. I appendiks F er der en mere detaljeret gennemgang af de enkelte lokaliteter med følgende oplysninger:

- Overordnet vurdering af lokalitetens potentiale for stimuleret *in situ* reaktiv deklorering

- Konceptuel model med oplysning om forureningsudbredelse samt geologiske- og hydrogeologiske forhold
- Luftfoto af lokalitet med udbredelse af grundvandsforurening
- Datablad med beskrivelse af basisoplysninger, oplysninger om geologi, hydrogeologi, forureningsforhold, geokemiske oplysninger samt logistiske forhold
- Resultat af screening med angivelse af delscore for de enkelte kategorier

Det fremgår, at 7 af lokaliteterne er tidligere eller eksisterende renseserier, hvor PCE er den typiske forureningskomponent. 5 af lokaliteterne er tidligere maskinværksteder, hvor den væsentligste forureningskomponent er TCE. På lokalitet nr. 13 er der desuden en forurening med krom(VI) i grundvandet. Her er formålet med den stimulerede reductive deklorering både at nedbryde TCE og reducere krom(VI) forureningen til krom(III) som har en meget lav opløselighed i grundvandet. Den sidste lokalitet er en tidligere asfaltfabrik, hvor der er sket forurening med TCE.



Tabel 8.2 Oversigt over lokaliteter og definition af indsatsområde for screening

Lokalitet	Anvendelse	Nuværende arealanvendelse	Forurening	Indsatsområde	Dybde af indsatsområde (m u.t.)
1. Nørregade 4, Assens	Tidligere renseri	Bolig	PCE	Øvre sekundære magasin <sup>3)</sup>	2,5-5
2. Adelgade 138, Bogense	Tidligere renseri	Bolig	PCE, TCE, DCE	Sekundære magasin <sup>3)</sup>	2-6
3. Dalumvej 22-28, Odense	Tidligere renseri	Erhverv	PCE	1): Sekundære magasin. 2): Evt. kildeområde	1): 5-9 m u.t. 2): 3,5-6,5
4. Dalumvej 34B, Odense	Eksisterende renseri	Renseri	PCE	Sekundære magasin <sup>3)</sup>	4-10
5. Dalumvej 62, Odense	Tidligere renseri	Farvehandel	PCE	Sekundære magasin	4-10
6. Middelfartvej 126, Odense	Tidligere renseri	Ubenyttet	PCE	1): Sekundære magasin 2): evt. kildeområde	1: 7-15 (20) 2: 5-11
7. Sanderumvej 113, Odense	Tidligere maskinfabrik	Erhverv	TCE	Sekundære magasin	2-5
8. Rønnevej 13-15 Næsby	Tidligere maskinfabrik	Erhverv	TCE	Sekundære magasin	7-12
9. Rugårdsvej 166, Odense	Eksisterende renseri	Renseri	PCE	Sekundære magasin/jord	3-8
10. Rugårdsvej 234 – 238, Odense	Tidligere maskinfabrik	Erhverv	(TCE), DCE, VC	1): Sekundære magasin, 2): Evt. Kildeområde	1): 10-15 2): 3 – 10
11. Sortebrovej 26, Tommerup	Tidligere maskinfabrik	Erhverv, lager	TCE	Kildeområde til 20 m u.t.	5-20
12. Bogensevej 39, Årup	Tidligere asfalt fabrik, fyldplads	Ubenyttet	TCE	Nedre sekundære magasin	16-25
13. Industrigrund, Svendborg	Maskinfabrik (galvanisering)	Erhverv	TCE, Cr(VI)	Øvre sekundære magasin <sup>3)</sup>	3 - 7

Note

- 1) Primære indsatsområde
- 2) Sekundære indsatsområde
- 3) Kildeområde oprenses i 2004

### 8.3.2 Definition af indsatsområde

For at gennemføre screeningen er det på forhånd nødvendigt at definere et indsatsområde for oprensningen. På en lokalitet vil der typisk være flere indsatsområder, eksempelvis jordforureningen i kildeområdet (over/under grundvandsspejlet) og forureningen i grundvandet. Da metoden kun er påvist effektivt i den mættede zone, vil indsatsområdet i kildeområdet kun være den del af forureningen, som findes i den mættede zone.

De valgte indsatsområder for de 13 lokaliteter ses af tabel 8.2. Det fremgår, at det typiske indsatsområde er det sekundære magasin. For lokalitet nr. 11 er indsatsområdet selve kildeområdet i moræneleren ned til 20 m's dybde. På denne lokalitet er der sket en betydelig nedadrettet forureningsspredning i selve moræneleren.

For lokaliteterne 3, 6 og 10 er der angivet 2 mulige indsatsområder (det primære og sekundære indsatsområde). Det primære indsatsområde er her et

grundvandsmagasin med god permeabilitet, og det sekundære indsatsområde er selve kildeområdet (moræneler i den mættede zone).

Der er kun gennemført screening af det primære indsatsområde. Da det først og fremmest er den hydrauliske ledningsevne, som er anderledes mellem de to indsatsområder, er det dog relativt nemt også at gennemføre en screening på det sekundære indsatsområde.

For lokalitet nr. 7 er der konstateret en meget udbredt forurening i det primære magasin. Der er fundet ca. 350 µg/l af TCE/PCE 200 m fra kildeområdet, og forureningen er ikke afgrænset horisontalt. Det vurderes dog på forhånd at være urealistisk at oprense forureningen i det primære magasin med stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på grund af den store horisontale og vertikale udbredelse. Desuden er forureningskoncentrationen og -mængde i det primære magasin for lille til at være cost-effektiv. Der er derfor ikke gennemført en screening på det primære magasin. Indsatsområdet for lokalitet nr. 7 er det sekundære magasin, hvor der er fundet de højeste forureningskoncentrationer.

#### 8.4 Resultat af screeningen

I dette afsnit præsenteres de overordnede resultater af screeningen. De 4 overordnede screeningskategorier gennemgås enkeltvis herunder:

- Forundersøgelser og hydrogeologisk profil
- Forureningsprofil
- Geokemisk profil
- Logistisk profil

I appendiks F fremgår de detaljerede screeningsdata for hver lokalitet.

##### 8.4.1 Forundersøgelser og hydrogeologisk profil

Oplysninger om den horisontale og vertikale forureningsudbredelse og de vigtigste geologiske og hydrogeologiske parametre fremgår af tabel 8.3. Resultaterne af screeningen (den hydrogeologiske profil) fremgår ligeledes af tabellen.

Det ses, at den horisontale udbredelse af forureningen varierer mellem 50 og 350 m. Det er dog nødvendigvis ikke hele fanen, som vil indgå i indsatsområdet. Typisk vil en oprensning koncentrere sig om den kraftigste forurening omkring kildeområdet og umiddelbart nedstrøms herfor.

Dybden af forureningen er typisk under 15 meter bortset fra lokalitet nr. 11 og 12 hvor forureningen ligger ned til henholdsvis 20 og 25 meters dybde. Dybe forureninger giver lav score i modellen, fordi det medfører ekstra omkostninger til borearbejde. Ved lokalitet nr. 6 øges dybden til forureningen, jo længere man kommer væk fra kildeområdet (op til 20 m u.t. i den yderste del af fanen). Det vil derfor være relativt dyrt at gennemføre afværge i denne del af fanen. Indsatsen kunne derfor koncentreres om den del af fanen, som ligger tættere på kildeområdet i mindre dybder.

Den hydrauliske ledningsevne varierer fra  $>10^{-5}$  m/s (sandede aflejringer) til ca.  $10^{-9}$  m/s i de lerede aflejringer. De sandede aflejringer giver de bedste muligheder for at tilsætte og sprede elektrondonorerne - og både aktive og passive metoder kan anvendes. For de lerede lokaliteter (nr. 2, 4, 7, 9 og 11) vil det på forhånd være vanskeligt at tilføre elektrondonorer - her vil passive metoder med tilsætning af langtsomtfrigivende elektrondonorer være mest nærliggende.

Resultaterne af screeningen viser en stor spredning mellem de enkelte lokaliteter, hvilket først og fremmest skyldes forskelle i den hydrauliske ledningsevne. Ved screeningen har lokalitet nr. 3, 5, 6 og 10 fået de højeste antal point. Alle disse lokaliteter har en høj hydraulisk ledningsevne (sand). De detaljerede undersøgelser, som er udført på disse lokaliteter, bidrager ligeledes til den høje score.

Lokalitet nr. 1, 2, 7, 9 og 11 har opnået de laveste scorere - dette skyldes først og fremmest den lave permeabilitet på disse lokaliteter (ler).

Tabel 8.3. Resultat af screening af Forundersøgelser og hydrogeologisk profil.

Lokalitet	Faneudbredelse (m)	Dybde af forurening (m u.t.)	Geologi	Hydraulisk ledningsevne (m/s)	Score
1. Nørregade 4, Assens	ca. 80	2,5-5	Sand, silt, ler	$5 \times 10^{-5} - 10^{-9}$ v)	0
2. Adelgade 138, Bogense	ca. 150	2-6	Moræneler med sandslirer	$10^{-5} - 10^{-8}$ v)	-1
3. Dalumvej 22-28, Odense	1): ca. 200	1): 5-9 m u.t. 2): 3,5-6,5	1): Sand 2): Moræneler	1): $5 \times 10^{-5}$ 2): $10^{-8}$ v)	34
4. Dalumvej 34B, Odense	150-200	4-10	Moræneler med sandslirer	$4,8 \cdot 10^{-6}$ til $8,4 \times 10^{-7}$	9
5. Dalumvej 62, Odense	ca. 100	4-10	Sand-grus	$2 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-5}$	31
6. Middelfartvej 126, Odense	1: 300 - 350	1: 7-15 (20) 2: 5-11	1: Sand 2: Moræneler	1): $5 \times 10^{-5}$ 2): $10^{-8}$ v)	30
7. Sanderumvej 113, Odense	ca. 100	2-5	Moræneler med sandstriber	$10^{-5} - 10^{-8}$ v)	0
8. Rønnevej 13-15 Næsby	>100	7-12	Sand, silt	$>1 \times 10^{-6}$	14
9. Rugårdsvej 166, Odense	50	3-8	Moræneler med sandstriber	$10^{-5} - 10^{-8}$ v)	-2
10. Rugårdsvej 234 - 238, Odense	1): Ca. 100	1): 10-15 2): 3 - 10	1): Sand 2): ML, silt, ler	1): $1,3-13 \times 10^{-5}$ 2): $10^{-5}-10^{-9}$ v)	32
11. Sortebrovej 26, Tommerup	ca. 30-50	5-20	Moræneler med sandstriber	$5 \times 10^{-5} - 10^{-8}$ v)	2
12. Bogensevej 39, Årup	80	16-25	Sand	$>10^{-5}$	25
13. Industrigrund, Svendborg	ca. 100 for TCE > 150 for Cr(VI)	3 - 7	Sandindslag i moræneler	ca. $10^{-5}$ (sandlagene)	25

Noter:

- 1) Sekundære magasin
- 2) Kildeområde over sekundære magasin
- ML) Moræneler
- v) Skønnet værdi, da den hydrauliske ledningsevne ikke er angivet i rapport

#### 8.4.2 Forureningsprofil

Tabel 8.4 viser de maksimale forureningskoncentrationer som er målt i grundvandet på de enkelte lokaliteter. Resultatet af screeningen fremgår ligeledes af tabellen.

På de fleste lokaliteter er der fundet betydelige indhold af især *cis*-DCE, hvilket indikerer, at der sker anaerob deklorering af de klorerede opløsningsmidler. Forekomsten af VC er mest fremtrædende på lokalitet nr. 2, 9 og 10. Grundvandsprøver fra lokalitet nr. 5 og 8 viser stort set ikke indhold af *cis*-DCE og VC. Det er i overensstemmelse med, at grundvandet på disse 2 lokaliteter er aerobt.

Der er kun påvist slutproduktet ethen og ethan på en lokalitet (nr. 10), hvor der sker der fuldstændig nedbrydning af forureningen med TCE. På de øvrige lokaliteter med højt indhold af *cis*-DCE og VC er det ikke dokumenteret, at der kan ske fuldstændig nedbrydning under de naturlige forhold. Generelt måles der høje indhold af *cis*-DCE (TCE på PCE lokaliteter), mens forekomsten af VC på en række lokaliteter er mindre fremtrædende. Det kan tyde på en begrænset eller slet ingen tilstedeværelse af *Dehalococcoides*.

Ved screeningen ses en stor spredning på de opnåede points. Lokalitet nr. 10 har fået den klart højeste score, hvilket først og fremmest skyldes, at der er konstateret ethen og ethan i grundvandet.

De laveste score er givet til lokalitet nr. 8. Det skyldes fraværet af nedbrydningsprodukter, samt at de høje koncentrationer af TCE indikerer forekomst af fri fase. Også lokalitet nr. 5 har fået lav score. På denne lokalitet er der ligeledes ikke fundet betydeligt indhold af nedbrydningsprodukter.

Tabel 8.4. Resultat af screening af Forureningsprofil. Oversigt over maksimalt målte forureningsindhold i grundvandsprøver ( $\mu\text{g/L}$ ) fremgår ligeledes.

Lokalitet	PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	VC	Ethen/ ethan	Score
1. Nørregade 4, Assens	13.000	324	1.100	34	Ikke målt	20
2. Adelgade 138, Bogense	1.000	3.600	11.800	210	<10	22
3. Dalumvej 22-28, Odense	56.000	4	640	20	<10	15
4. Dalumvej 34B, Odense	2-10.000	ca. 100	Ca. 90	ca. 20	Ikke målt	20
5. Dalumvej 62, Odense	1.100	1600	5	<0,2	Ikke målt	0
6. Middelfartvej 126, Odense	18.000	2.500	200	69 <sup>4)</sup>	<10	20
7. Sanderumvej 113, Odense	1): 2900	1): 6.700	1): 1,6 <sup>3)</sup>	1): 0,4 <sup>3)</sup>	Ikke målt	7
8. Rønnevej 13-15 Næsby	-	110.000	15	<1	Ikke målt	-10
9. Rugårdsvej 166, Odense	110.000	1.500	4.600	1.900	Ikke målt	10
10. Rugårdsvej 234 – 238, Odense	-	1): 16 2): 140	1): 32.000 2): 10.000	1): 5.100 2): 6.500	1): 92/12 2): 25/11	40
11. Sortebrovej 26, Tommerup	-	32.000	3.400	53	<10	20
12. Bogensevej 39, Årup	-	90-170	120-560	1	Ikke målt	5
13. Industrigrund, Svendborg	-	10.000	500	10	<10	20

Note

- 1): Sekundære magasin
- 2): Kildeområde
- 3): Kun 2 analyser
- 4): I fanen under 2  $\mu\text{g/l}$

### 8.4.3 Geokemisk profil

Resultaterne af den geokemiske screening fremgår af tabel 8.5. Vurdering af redoxforholdene samt indhold af de væsentligste redoxparametre fremgår ligeledes af tabellen. Der er ikke medtaget målinger af redoxpotentiale og methan, idet disse parametre kun er målt på få af lokaliteterne.

Der er fundet både aerobe og anaerobe forhold. De mest reducerede redoxforhold er fundet på lokalitet nr. 10 (jernreducerende). Der er dog ikke fundet stærkt anaerobe forhold med betydende indhold af methan og sulfid på nogen af lokaliteterne.

Der ses en relativ stor spredning i resultaterne af screeningen. De laveste scorere er givet til lokaliteter med aerobe forhold (nr. 5, 8, 12 og 13). Herudover har lokaliteter med få geokemiske data også fået lav score (nr. 4, 7, 9 og 12). De højeste score er givet til de lokaliteter med de mest reducerede forhold, og hvor de geokemiske forhold er godt belyst (nr. 3, 6, 10 og 11).

Sammenholdes redoxforholdene med fund af nedbrydningsprodukter (tabel 8.3) ses, at der som forventet kun findes ubetydelige indhold af *cis*-DCE og VC i de aerobe magasiner (nr. 5 og 8). Det er dog ikke gældende for lokalitet nr. 12, men her er nedbrydningen med stor sandsynlighed sket under transporten gennem den umættede zone.

Kvaliteten af redoxmålingerne er svingende. Det er især ilt og jernmålingerne, som ikke altid er repræsentative for det reelle indhold i grundvandet. Der ses således ofte høje indhold af både opløst jern og ilt (og nitrat) i vandprøverne. Dette er normalt ikke muligt, idet opløst jern ikke vil forekomme sammen med ilt i grundvandet og omvendt.

Tabel 8.5 resultat af screening af geokemisk profil. Herudover beskrivelse af udvalgte redoxparametre.

Lokalitet	Redox-forhold	Ilt (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Jern(II) (mg/l)	Sulfat (mg/l)	Score
1. Nørregade 4, Assens	Vekslede fra anaerob (nitrat-jernreducerende) til aerob	0,7-4,5	<0,5 - 77	<0,05-0,47	75-150 (340)	3
2. Adelgade 138, Bogense	Vekslede fra anaerob (nitrat-reducerende) til aerob	3-8 <sup>1)</sup>	<1 - 3	<0,01-1,3	87-173	7
3. Dalumvej 22-28, Odense	Anaerob: Nitrat-jernreducerende	<1	<1-4	<0,01-1,7	45-140	13
4. Dalumvej 34B, Odense	i.o.	0,7 - 7 <sup>2)</sup>	i.o.	i.o.	i.o.	3
5. Dalumvej 62, Odense	Aerob	3	33	<0,01	31	0
6. Middelfartvej 126, Odense	Anaerob	<1,5	Typisk < 1	Typisk >1	160-240	12
7. Sanderumvej 113, Odense	i.o.	i.o.	i.o.	i.o.	i.o.	0
8. Rønnevej 13-15 Næsby	Aerob	>2 <sup>2)</sup>	i.o.	i.o.	i.o.	0
9. Rugårdsvej 166, Odense	i.o.	i.o.	i.o.	i.o.	i.o.	0
10. Rugårdsvej 234, Odense	Anaerob: Jernreduceret	0,3-2,8 <sup>1)</sup>	Typisk < 1 mg/l	1,1-3,7	62-161	16
11. Sortebrovej 26, Tommerup	Anaerob	< 1 (op til 7,7) <sup>1)</sup>	<0,5	0,15-0,55 <sup>1)</sup>	55-110	20
12. Bogensevej 39, Årup	Aerob	11	14	0,7 <sup>1)</sup>	30	-3
13. Industrigrund, Svendborg	Aerob - nitratreducerende	1-6	<0,5 - 7	<0,01 - 0,24	22 - 84	0

Noter

- 1) Sandsynligvis påvirket af prøvetagningen
- 2) Feltnmålinger
- i.o. Ikke oplyst

#### 8.4.4 Logistiske forhold

Resultaterne af screeningen af de logistiske forhold fremgår af tabel 8.6. Vurdering af adgangsforholdene, som vurderes at være den vigtigste faktor i den logistiske profil, fremgår ligeledes af tabellen.

Generelt er der ikke den store spredning på resultaterne. Forhold som elektricitet, teknikker på lokaliteten, eksisterende pump & treat anlæg og afstand til drikkevandsboringer/recipienter har stort set givet samme score for alle lokaliteterne. På lokalitet nr. 9 er der dog givet negativ score pga. nærliggende recipient.

Den største spredning i resultaterne ses for adgangsforholdene. Lokalitet nr. 11 har således fået den højeste score, idet adgangsforholdene er gode og lokaliteten ligger ugeneret. Også lokalitet nr. 12 ligger ugeneret, men her er der langt til elektricitet, hvilket har påvirket scoren negativt.

På de øvrige lokaliteter er adgangsforholdene generelt dårligere. Typisk er der problemer med nærliggende bygninger eller bygninger ovenpå forureningen. Lokalitet nr. 1 og 9 har de dårligste adgangsforhold, idet den væsentligste forurening ligger under eksisterende bygninger. Men også på lokalitet nr. 6 (der generelt har høj score) må der forventes vanskeligheder med adgangsforholdene, idet fanen ligger under et større villaområde. Såfremt der skal ske oprensning i hele fanen, skal mange grundejere involveres i projektet, hvilket ikke vil være uproblematisk. Alternativt kan oprensningsindsatsen koncentreres til området ved og umiddelbart nedstrøms kildeområdet, hvor adgangsforholdene er bedre.

Tabel 8.6. Resultat af screening af logistiske forhold. Herudover beskrivelse af adgangsforhold.

Lokalitet	Adgangsforhold	Vurdering	Score
1. Nørregade 4, Assens	Dårlig	Kildeområde og en del af fane ligger under bygninger og veje	2
2. Adelgade 138, Bogense	Middel	En del af kildeområde ligger under bygninger. Største del af fane ligger i villahaver.	2
3. Dalumvej 22-28, Odense	Middel	God adgang til kildeområde (parkeringsplads) Dog en del gennemgående færdsel. En del af fanen ligger under bygning/haver.	5
4. Dalumvej 34B, Odense	Middel	En del af fane ligger under bygninger (Lykkeshåbs Alle 4-6). Resterende del af fane ligger i villahaver.	2
5. Dalumvej 62, Odense	Middel	Kildeområde og del af fane ligger under bygninger	5
6. Middelfartvej 126, Odense	Middel-god	God adgang til kildeområde (ubenyttet område). Fane ligger under villaområde med haver/beboelse. Mange grundejere.	2
7. Sanderumvej 113, Odense	Middel	God adgang til kildeområde. En stor del af fanen ligger under bygning.	2
8. Rønnevej 13-15 Næsby	Middel	God adgang til kildeområde. En del af fanen ligger under bygninger	2
9. Rugårdsvej 166, Odense	Dårlig	Den væsentligste forurening ligger under bygninger	0
10. Rugårdsvej 234 – 238, Odense	Middel-god	God adgang til kildeområde. En del af fanen ligger i villahaver. Tæt på beboelse.	5
11. Sortebrovej 26, Tommerup	God	Ugeneret område. Ingen bygninger eller følsom anvendelse. Kun lidt færdsel på lokaliteten.	10
12. Bogensevej 39, Årup	God	Ingen bygninger indenfor 100 m. Ugeneret. Mangler elektricitet.	5
13. Industrigrund, Svendborg	Middel	God adgang til kildeområde. Hovedparten af fanen ligger under bygninger. Dog muligt at injicere under bygninger.	2

#### 8.4.5 Samlet score

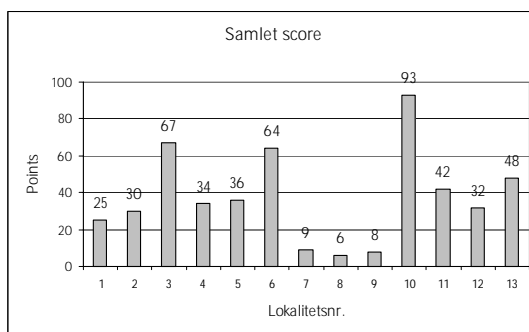
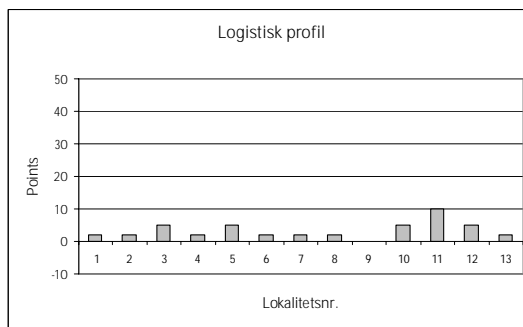
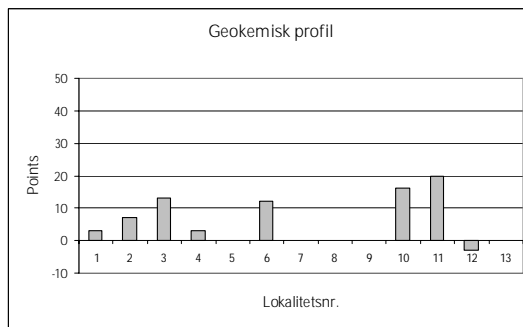
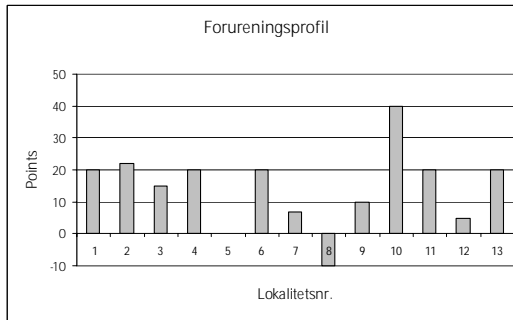
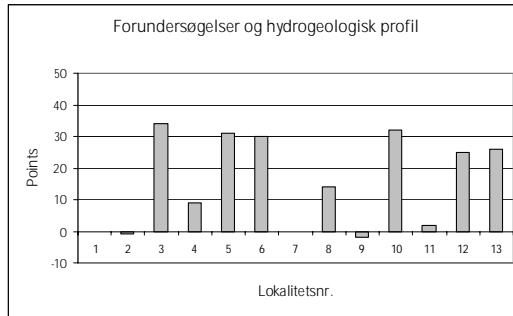
Det samlede resultat af screeningen fremgår af tabel 8.7 og figur 8.1. Det ses at lokaliteterne nr. 3, 6 og 10 skiller sig ud med de højeste scorere. Herefter følger lokalitet nr. 13, 11 og 5. Lokalitet nr. 10 ligger i "top 5" i alle 4 screeningskategorier, medens lokalitet nr. 3, 6 og 11 ligger i "top 5" for 3 af de 4 kategorier.

Lokaliteterne nr. 7, 8 og 9 har fået de laveste scorere.

Tabel 8.7. Samlet score for screeningen.

Lokalitet	Hydro-geologisk profil	Forureningsprofil	Geokemisk profil	Logistisk profil	Samlet score	Samlet placering
1. Nørregade 4, Assens	0	20	3	2	25	10
2. Adelgade 138, Bogense	-1	22	7	2	30	9
3. Dalumvej 22-28, Odense	34	15	13	5	67	2
4. Dalumvej 34B, Odense	9	20	3	2	34	7
5. Dalumvej 62, Odense	31	0	0	5	36	6
6. Middelfartvej 126, Odense	30	20	12	2	64	3
7. Sanderumvej 113, Odense	0	7	0	2	9	11
8. Rønnevej 13-15 Næsby	14	-10	0	2	6	13
9. Rugårdsvej 166, Odense	-2	10	0	0	8	12
10. Rugårdsvej 234, Odense	32	40	16	5	93	1
11. Sortebrovej 26, Tommerup	2	20	20	10	42	5
12. Bogensevej 39, Årup	25	5	-3	5	32	8
13. Industrigrund, Svendborg	26	20	0	2	48	4





Figur 8.1 Resultat af screening

## 8.5 Udvalgelse af lokaliteter

Ved opstart af dette Teknologiprojekt i foråret 2003 var det hensigten, at der skulle udvælges 6 lokaliteter til videre studier (felt- og laboratorieundersøgelser). Ved afslutning af nærværende projekt, er det dog ændret til, at der nu kun udføres videre studier på én lokalitet i forbindelse med Teknologiprojektet (lokalitet nr. 10, Rugårdsvej 234). Dette afsnit beskriver dog den oprindelige udvælgelse af de 6 lokaliteter.

De 6 udvalgte lokaliteter skulle repræsentere forskellige geologiske, hydrogeologiske, geokemiske, mikrobiologiske og forureningsmæssige forhold. Som udgangspunkt udvælges de 3 lokaliteter, som har opnået de højeste scorer ved screeningen. Disse vil være de mest lovende for opnåelse af effektiv reduktiv deklorering over en relativ kort periode.

Derudover udvælges 3 lokaliteter som umiddelbart er knap så velegnede til stimulering af den reduktive deklorering. Af disse 3 lokaliteter udvælges én grund med aerobe forhold, eller hvor der er fravær af nedbrydningsprodukter, og én grund med lav hydraulisk ledningsevne (morænelerslokalitet). Desuden vælges én lokalitet med en blandingsforurening.

På baggrund af ovennævnte kriterier er der udvalgt 6 lokaliteter, som fremgår af tabel 8.8. Nøgleinformationer om de enkelte lokaliteter er ligeledes medtaget i tabellen, herunder vurdering af mulige afværgestrategier (passive - aktive systemer).

Ved udvælgelse indgår de 3 lokaliteter med de højeste scorer (mest egnede lokaliteter). Herudover indgår en lerlokalitet, en lokalitet med aerobe forhold og en lokalitet med en blandingsforurening (TCE og krom(VI)). De 3 sidstnævnte lokaliteter er placeret som nr. 4, 5 og 6 i den samlede score.

- De 3 mest egnede lokaliteter:  
Dalumvej 22-28, Middelfartvej 126 og Rugårdsvej 234 har fået de 3 højeste scorer og vurderes alle som velegnede lokaliteter til at afprøve metoden. De 3 lokaliteter har alle forurening i permeable sandlag. Desuden repræsenterer de 3 lokaliteter forskellige nedbrydningsforhold fra begrænset nedbrydningsaktivitet (nr. 3) til fuldkommen reduktiv deklorering (nr. 10). Bioaugmentation kan muligvis være relevant på flere af lokaliteterne.
- Aerob lokalitet:  
Dalumvej 62 (nr. 5) repræsenterer aerobe forhold. Lokaliteten har fået en relativ høj score (nr. 5), selvom de geokemiske og nedbrydningsmæssige forhold ikke er gunstige. Den gode hydrauliske ledningsevne samt den relativt smalle fane og lave dybde til forureningen har givet en god score. Rønnevej 13-15 er også en aerob lokalitet, men denne har fået en meget lav score. Det skyldes en ufuldkommen belysning af geokemiske parametre, den relativt store forureningsudbredelse og evt. forekomst af fri fase. Grunden vurderes dog som rimelig egnet til afprøvning af metoden i et aerobt magasin, såfremt Dalumvej 62 ikke kan anvendes.
- Lerlokalitet:  
Sortebrovej 26 repræsenterer en lokalitet med lav hydraulisk ledningsevne (moræneler) og har fået relativ høj score for gode adgangsf forhold samt gunstige geokemiske forhold samt forekomst af

nedbrydningsprodukter. Ulemperne ved lokaliteten er en relativ stor vertikal udbredelse af forureningen. Kildeområdet ved Rugårdsvej 234, Dalumvej 22-28 og Middelfartvej 126 kan evt. også indgå til afprøvning af metoden i moræneler. Her vurderes kildeområdet ved Middelfartvej 126 og Rugårdsvej 234 som de bedst egnede pga. bedre adgangsforhold.

- Lokalitet med blandingsforurening

Lokalitet nr. 13 er en typisk østdansk lokalitet med forureningsspredning i mere eller mindre sammenhængende sandlag i moræneleren. Desuden er grunden interessant, idet der også er en forurening med krom(VI) i grundvandet. Den reductive deklorering skal både nedbryde de klorerede opløsningsmidler og reducere krom(VI) til krom(III) (som er immobil i grundvandet). Lokalitet nr. 13 har desuden en relativ høj score (placeret samlet som nr. 4).

Tabel 8.8 Forslag til udvælgelse af 6 lokaliteter

Lokalitet	Rugårdsvej 234, Odense	Dalumvej 22-28, Odense	Middelfartvej 126, Odense	Sortebrovej 26, Tommerup	Dalumvej 62, Odense	Industrigrund, Svendborg
Lokalitetnr.	10	3	6	11	5	13
Samlet score	93	67	64	42	36	48
Indsatsområde	1: S 2: K	1: S 2: K	1: S 2: K	K	S	S
Geologi	1: Sand 2: Moræneler, ler	1: Sand 2: Moræneler	1: Sand 2: Moræneler	Moræneler	Sand	Sand
Dybde af forurening	1: 10-15 2: 3 – 10	1: 5-9 m u.t. 2: 3,5-6,5	1: 7-15 (20) 2: 5-11	5-20	4-10	3-7
Hydraulisk ledningsevne (m/s)	1: $1,3-13 \times 10^{-5}$ 2: $10^{-5}-10^{-9}$ v)	1: $5 \times 10^{-5}$ 2: $10^{-8}$ v)	1: $5 \times 10^{-5}$ 2: $10^{-8}$ v)	$10^{-8}$	$5,6 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$10^{-5}$ v)
Forureningskomponenter	(TCE), DCE, VC	PCE	PCE	TCE	PCE	TCE, Cr(VI)
Maks. koncentration (µg/L)	DCE: 32.000	56.000	18.000	32.000	1.100	TCE: 10.000 Cr(VI):6000
Redoxforhold	Anaerob: jernreducerende	Anaerob: nitrat- jernreducerende	Anaerob	Anaerob	Aerob	Aerob - Nitrat- jernreducerende
Reduktiv deklorering uden stimulering	Ja, fuldstændig nedbrydning til ethen	Lille aktivitet, mangler data i fanen	Ja	Ja	Ingen	Ja
Adgangsforhold	Middel – god	Middel	Middel – god	God	Middel	Middel
Bemærkning	<i>Dehalococcoides</i> formentlig tilstede	Begrænset naturlig nedbrydning. evt. bioaugmenta-tion	Treatability studier pågår	Lerlokali-tet. Treatability studier pågår	Aerob lokalitet. Bioaugmen-tation sandsynligvis nødvendig. Lave koncentrationer	TCE og Krom(VI) forurening
Mulige afværgeopsætning	Aktiv, passiv	Aktiv, passiv	Aktiv, passiv	Passiv	Aktiv, passiv	Passiv

**Note**

- 1 Primære indsatsområde
- 2 Sekundære indsatsområde
- S Sekundære magasin
- K Kildeområde
- V) Vurderet

## 8.6 Vurdering af screeningsmodel

Ud fra den gennemførte screening på 13 fynske lokaliteter er der følgende bemærkninger:

- Den gennemførte screening viser stor spredning på resultaterne mellem de enkelte lokaliteter. De lokaliteter, som har opnået den højeste score, er også de lokaliteter, som umiddelbart vurderes at være de mest egnede lokaliteter. De lokaliteter, som har opnået de laveste scorere, er også de lokaliteter, hvor der umiddelbart vurderes at være de vanskeligste forhold for afværgemetoden. Det har således været forholdsvis nemt at udvælge de mest egnede lokaliteter. Modellen afspejler tilsyneladende det forventede på baggrund af en kvantitativ evaluering.
- Der ses ikke den store variation i de opnåede points for den logistiske profil. Desuden er de opnåede point generelt lave for den logistiske profil i forhold til de andre kategorier.
- Det kan være vanskeligt at give repræsentative points for forekomst af nedbrydningsprodukter i forureningsprofilen. Skal der eksempelvis gives point for et VC indhold på 10 µg/l i forhold til en udgangskoncentration på 20.000 µg TCE/l? Det kan der ikke svares generelt på, da det vil afhænge af en konkret vurdering af koncentrationerne for flere boringer. Det er ikke realistisk at indbygge en mere avanceret scoring (forskellige ratioer) på dette niveau, da sådanne beregninger ofte kræver et større datasæt for at give mening.
- Selv om en lokalitet har fået en lav score, er det ikke ensbetydende med at stimuleret *in situ* reduktiv deklorering ikke kan være attraktiv som afværgemetode på den konkrete grund. Det må dog forventes, at det vil være vanskeligere at oprense forureningen med metoden, end på de lokaliteter, der har opnået en højere score.

Lokaliteter med lav score er typisk også de lokaliteter, hvor anvendelse af andre *in situ* metoder er vanskelig. Derfor kan anvendelse af stimuleret *in situ* reduktiv deklorering på lokaliteter med lav score stadig være en af de mest attraktive metoder.

I højpermeable aflejringer, som scorer højt i modellen, vil der typisk være en række andre metoder, som også kan anvendes (eksempelvis kemisk oxidation, air sparging og afværgepumpning).

- Ved screeningen af de 13 lokaliteter er det valgt at give scoren 0 såfremt der mangler data. Det betyder, at lokaliteter med manglende data godt kan få en højere score end en identisk lokalitet med et bedre datagrundlag. Et eksempel herpå kunne være 2 aerobe lokaliteter. På den ene lokalitet er der ingen iltmålinger og på den anden lokalitet er der iltmålinger, der viser et iltindhold på 5 mg/l. Lokaliteten uden iltmålinger ville her få scoren 0 mens lokaliteten med iltmålinger ville få scoren -3. Betydningen af manglende datagrundlag skal derfor altid vurderes ved sammenligning af lokaliteter. Alternativt kunne det vælges at give den laveste score ved manglende datagrundlag, for eksempel -3 for manglende iltdata.

Det skal pointeres, at screeningsmodellen i første omgang, er udviklet til at screene 13 fynske lokaliteter. Det vurderes dog, at modellen også kan anvendes i andre lignende sager med klorerede opløsningsmidler. Screeningsmodellen kan også anvendes som en tjekliste til at vurdere hvilke forhold, man skal være opmærksom på, hvis stimuleret reaktiv deklorering overvejes som afværgemetode.

Man skal dog være varsom med at sammenligne totalscoren for screeningen. Her vil lokaliteter med høj hydraulisk ledningsevne og fund af nedbrydningsprodukter altid score højest. Der kan dog godt være lokaliteter hvor stimuleret reaktiv deklorering er en cost effektiv oprensningstype, selvom den hydrauliske ledningsevne er lav, og der ikke er fundet væsentligt indhold af nedbrydningsprodukter, da andre *in situ* metoder sandsynligvis også her være problematiske at anvende. Derimod kan man med fordel sammenligne delscoren for de enkelte kategorier ved screening af flere lokaliteter.



# 9 Referenceliste

## 9.1 Referenceliste

- Acton, D.W., & J.F. Barker. 1992. *In situ* Biodegradation Potential of Aromatic Hydrocarbons in Anaerobic Groundwaters. **J. Contam. Hydrol.**, 9:325-352.
- Adamson, D. T. & G.F. Parkin. 2000. Impact of Mixtures of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons on a High-Rate, Tetrachloroethene-Dechlorinating Enrichment Culture. **Environ. Sci. Technol.**, 34:1959-1965.
- Adamson, D.T., J.M. McDade, & J.B. Hughes. 2003. Inoculation of DNAPL Source Zone to Initiate Reductive Dechlorination of PCE. **Environ. Sci. Technol.**, 37(11):2525-2533.
- Alford, G. and R. Cullimore. 1999. The Application of Heat and Chemicals in the Control of Biofouling. Events in Wells, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1999
- Allison, D.G., T. Maira-Litran, and P. Gilbert. 2000. "Antimicrobial Resistance of Biofilms", in **Biofilm. Control in Industrial Systems: Approaching an Old Problem in New Ways**, In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000
- Alvarez-Cohen, L. & G.E. Speitel. 2001. Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. **Biodegradation**, 12:105-126.
- Amternes Videncenter for Jordforurening. Håndbog i prøvetagning af jord og grundvand. Teknik og Administration. Nr. 3. 2003.
- Anderson, D., M. Ochsner, C. Sandefur, S. Koenigsberg. 2000. Remedial Action Using HRC Under a State Dry Cleaning Program. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 213-219.
- Aziz, C.E., M.M. Hampton, M. Schipper, & P. Haas. 2001. Organic Mulch Biowall Treatment of Chlorinated-Solvent-Impacted Groundwater. I: Leeson, A., B.C. Alleman, P.J. Alvarez, & V.S. Magar (Eds.), Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 73-78.
- Bachmat, Y., S. Mandel, & M. Bugayevski. 1988. A Single-well Tracer Technique for Evaluating Aquifer Parameters, I. Theoretical work. **J. of Hydrol.**, 99:143-163.
- Bagley, D.M., M. Lalonde, V. Kaseros, K.E. Stasiuk, & B.E. Sleep. 2000. Acclimation of anaerobic systems to biodegrade tetrachloroethene in the



- presence of carbon tetrachloride and chloroform, *Water Research*, 34:171-178.
- Ballapragada, B.S., H.D. Stensel, J.A. Puhakka, & J.F. Ferguson. 1997. Effect of hydrogen on reductive dechlorination of chlorinated ethenes, *Environ. Sci. Technol.*, 31:1728-1734.
- Battelle, 2004. Demonstration of Biodegradation of Dense, Nonaqueous-Phase Liquids (DNAPL) through Biostimulation and Bioaugmentation at Launch Complex 34 in Cape Canaveral Air Force Station, Florida Final Innovative Technology Evaluation Report. September 2004.
- Bjerg, P.L. & Arvin, E. 1998. Intern rensning af benzofureninger i grundvand. Amternes Videncenter for Jordforurening, København, Teknik & Administration Nr. 6. pp. 1-31.
- Bolesch, D.G., R.B. Nielsen, & J.D. Keasling, 1997. Complete reductive dechlorination of trichloroethene by a groundwater microbial consortium. *Bioremediation of Surface and Subsurface Contamination*, 829:97-102.
- Boyle, S.L., V.B. Dick, M.N. Ramsdell, & T.M. Caffoe. 2000. Enhanced Closure of a TCE Site Using Injectable HRC. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), *Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 255-262.
- Bradley, P.M., F.H. Chapelle, & D.R. Lovley. 1998. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3102-3105.
- Bradley, P.M., & F.H. Chapelle. 1998a. Microbial mineralization of VC and DCE under different terminal electron accepting conditions, *Anaerobe*, 4:81-87.
- Bradley, P.M. & F.H. Chapelle. 1998b. Effect of contaminant concentration on aerobic microbial mineralization of DCE and VC in stream-bed sediments, *Environ. Sci. Technol.*32:553-557.
- Bradley, P.M. & F.H. Chapelle. 2000. Aerobic microbial mineralization of dichloroethene as sole carbon substrate, *Environ. Sci. Technol.*,34:221-223.
- Burdick, J.S., K.A. McGuinness, E. Rodriguez, & D.J. Wanamaker. 2002. Pilot Test of Enhanced Reductive Dechlorination of TCE and Full-Scale Design. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), *Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds - 2002*. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Butler, B. J. & J. F. Barker. 1996. Chemical and microbiological transformation and degradation of chlorinated solvent compounds. I: *Dense Chlorinated Solvents and Other DNAPLs in Ground Water: History, Behavior, and Remediation*. J.F. Pankow, & J.A. Cherry, eds., Waterloo Press, Waterloo, Ontario, Canada, pp. 267-834.
- Carr, C.S., S. Garg, & J.B. Hughes. 2000. Effect of Dechlorinating Bacteria on the Longevity and Composition of PCE-Containing Nonaqueous

- Phase Liquids Under Equilibrium Dissolution Conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 34(6): 1088-1094.
- Castellanos, M.R., T.A. Peel, M.L. McMaster, J. Adkisson, & S. Dworatzek. 2002. Laboratory Evaluation of Enhanced Bioremediation of Chlorinated Ethenes in Groundwater at the MLP/VAB Area. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds - 2002. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Champ, D.R., J. Gulens, & R.E. Jackson. 1979. Oxidation-reduction sequences in ground water flow systems. *Can.J.Earth Sci.*, 16:12-23.
- Chang, P., C. Elder, K. Finneran, D. Major, P. Zeeb, & D. Wanty. 2003. Geochemical and Microbiological Characterization of in situ Reductive Dechlorination in Fractured Bedrock. Abstract. Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Orlando, Florida, June 2-5.
- Chang, P.R., P.J. Zeeb, C.R. Elder, R.B. Leary, G.A. Demers, D.W. Major, & D.A. Wanty. 2002. The Evolving Microbiology of an Enhanced Bioremediation Pilot Test Performed in Fractured Bedrock. Abstract. Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Monterey, California.
- Chapelle, F.H., D.A. Vroblesky, J.C. Woodward, & D.R. Lovley. 1997. Practical considerations for measuring hydrogen concentrations in groundwater. *Environmental Science & Technology* 31:2873-2877.
- Chapelle, F.H. 1996. Identifying redox conditions that favor the natural attenuation of chlorinated ethenes in contaminated groundwater systems. I: Symposium on Natural Attenuation of Chlorinated Organics in Groundwater. EPA/540/R-96/509. US EPA, Washington, DC, pp.17-20.
- Chapelle, F.H., P.B. McMahon, N.M. Dubrovsky, R.F. Fujii, E.T. Oaksford, & D.A Vroblesky. 1995. Deducing the Distribution of Terminal Electron-Accepting Processes in Hydrologically Diverse Groundwater Systems, *Water Resources Research*, 31:359-371.
- Christensen, T. H., P. Kjeldsen, B. Lindhardt. 1996. Gas-Generating Processes in Landfills. p 27-50. In Landfilling of Waste: Biogas; Christensen, T.H., Cossu, R., Stegmann, R. (ed.); E & FN Spon, London, 1996.
- Christensen, T.H., P.L. Bjerg, S. Banwart, R. Jakobsen, G. Heron, H.-J. Albrechtsen. 2000. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *J. Contam. Hydrol.*, 45:165-241.
- Cirpka, O.A., C. Windfuhr, G. Bisch, S. Granzow, H. Scholz-Muramatsu, & H. Kobus. 1999. Microbial reductive dechlorination in large-scale sandbox model, *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 125:861-870.
- Cope, N. & J.B. Hughes. 2001. Biologically-Enhanced Removal of PCE from NAPL Source Zones. *Environ. Sci. Technol.*, 35:2014-2021.
- Cox, E.E., & S. Neville. 2002. In Situ Bioremediation of Perchlorate: Comparison of Results from Multiple Field Demonstrations. Abstract. SERDP/ESTCP Partners in Environmental Technology Symposium & Workshop. Washington, DC, December 3 - 5, 2002.

- Cox, E.E., E.A. Edwards, S. Neville, G. Swanick, & D.W. Major 2000. Accelerated Bioremediation of Perchlorate and Trichloroethene in Groundwater. Abstract. Second International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Monterey, California, May 22-25.
- Cupples, A. M., A.M. Spormann, & P.L. McCarty. 2003. Growth of a *Dehalococcoides*-Like Microorganism on Vinyl Chloride and *cis*-Dichloroethene as Electron Acceptors as Determined by Competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:953-959.
- Davis, J.W., J.M. Odom, K.A. Deweerdt, D.A. Stahl, S.S. Fishbain, R.J. West, G.M. Klecka, & J.G. DeCarolis. 2002. Natural attenuation of chlorinated solvents at Area 6, Dover Air Force Base: characterization of microbial community structure, *J. Contam. Hydrol.*, 57:41-59.
- Davis, J.W. & Carpenter, C.L. 1990. Aerobic biodegradation of vinyl-chloride in groundwater samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3878-3880.
- Debruijn, W.P., M.J.J. Kotterman, M.A. Posthumus, G. Schraa, & A.J.B. Zehnder. 1992. Complete Biological Reductive Transformation of Tetrachloroethene to Ethane, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1996-2000.
- Dennis, P. C., B.E. Sleep, R.R. Fulthorpe, & S.N. Liss. 2003. Phylogenetic analysis of bacterial populations in an anaerobic microbial consortium capable of degrading saturation concentrations of tetrachloroethylene. *Canadian Journal of Microbiology*, 49:15-27.
- Dick, V.B., N.L. Case, & S.L. Boyle. 2001. Enhanced Bioremediation of High Contaminant Concentrations in Source Residual Area. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), *Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 27-33.
- DiStefano, T.D., & R. Baral. 2000. PCE Dechlorination With Complex Electron Donors I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), *Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 55-61.
- Dolfing, F. Thermodynamic Considerations for Dehalogenation. I: *Dehalogenation – Microbial Processes and Environmental Applications*. Häggblom, M.M. and Bossert, I.D. Kluwer Academic Publisher, USA, 2003.
- Dolfing, J. 1988. Acetogenesis. I: A. J. B. Zehnder (Ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms* (pp. 417-422). Wiley.
- Donlan, 2000. Biofilm Control in Industrial Systems: Approaching an Old Problem in New Ways, In: Evans LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 19-34.
- Duhamel, M., S.D. Wehr, L. Yu, H. Rizvi, D. Seepersad, S. Dworatzek, E.E. Cox, & E.A. Edwards. 2002. Comparison of Anaerobic Dechlorinating

- Enrichment Cultures Maintained on Tetrachloroethene, Trichloroethene, *cis*-Dichloroethene, and Vinyl Chloride. *Wat. Res.*, 36:4193-4202.
- Durant, N. GeoSyntec Consultants. 10015 Old Columbia Road, Suite A-200. Columbia, MD 21046. USA. Personlig vurdering, 2003.
- Dupin, H.J., and P.L. McCarty. 2000. "Impact Of Colony Morphologies And Disinfection On Biologically. Clogging In Porous Media", *Environmental Science & Technology*, 34(8):1513-1520.
- Dybas, M.J., D.W. Hyndman, R. Heine, J. Tiedje, K. Linning, D. Wiggert, T. Voice, X. Zhao, L. Dybas, & C.S. Criddle. 2002. Development, Operation, and Long-Term Performance of a Full-Scale Biocurtain Utilizing Bioaugmentation. *Environ. Sci. Technol.*, 36(16):3635-3644.
- El Mamouni, R., R. Jacquet, P. Gerin, & S.N. Agathos. 2002. Influence of electron donors and acceptors on the bioremediation of soil contaminated with trichloroethene and nickel: laboratory- and pilot-scale study, *Water Science and Technology*, 45: 49-54.
- Ellis, D.E., E.J. Lutz, J.M. Odom, R.J. Buchanan, C.L. Bartlett, M.D. Lee, M.R. Harkness, & K.A. Deweerdt. 2000. Bioaugmentation for Accelerated In Situ Anaerobic Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.*, 34(11):2254-2260.
- Environment Canada. 2001. "Guidelines for the Notification and Testing of New Substances: Organisms. Pursuant to the New Substances Notification Regulations of the Canadian Environmental Protection Act." Ottawa, Canada.  
<http://www.ec.gc.ca/substances/nsb/download/Bioge1201.PDF>
- Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP), 2001. Reductive Anaerobic Biological In-Situ Treatment Technology (RABITT) Treatability Test. Interim Report
- Environmental Technology Certification Testing Program. 2001. Reductive Anaerobic Biological *In situ* Treatment Technology (RABITT) Treatability Test Interim Report.
- Evans, P.J. & S.S. Koenigsberg. 2001. A Bioavailable Ferric Iron Assay and Relevance to Reductive Dechlorination. I: Leeson, A., Alleman, B.C., P.J. Alvarez & V.S. Magar (Eds.), Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry, pp. 209-215. Battelle Press, Columbus, OH
- Fam, S.A., M. Findlay, S. Fogel, T. Pirelli, & T. Sullivan. 2000. Full-Scale Anaerobic Bioremediation Using Acetate and Lactate Electron Donors. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 23-30.
- Fennell, D.E., & J.M. Gossett. Microcosms for Site-Specific Evaluation of Enhanced Biological Reductive Dehalogenation. I: *Dehalogenation – Microbial Processes and Environmental Applications*. Häggblom, M.M. & Bossert, I.D. Kluwer Academic Publisher, USA, 2003.
- Fennell, D.E., A.B. Carroll, J.M. Gossett, & S.H. Zinder. 2001. Assessment of Indigenous Reductive Dechlorinating Potential at a TCE-Contaminated

- Site Using Microcosms, Polymerase Chain Reaction Analysis, and Site Data. *Environ. Sci. Technol.*, 35(9):1830-1839.
- Fennell, D.E., J.M. Gossett, & S.H. Zinder. 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene, *Environ. Sci. Technol.*, 31:918-926.
- Fiacco, R.J., M.H. Daly, J.D. Fitzgerald, G. Demers, M.D. Lee, & D. Wanty. 2000. Anaerobic Bioremediation of Chlorinated VOCs in a Fractured Bedrock Aquifer - Preparations for an In Situ Pilot Study. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds.), *Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 405-412.
- Findlay, M., S. Fogel, D. Smoler, B.F. Droy, C. Creber, & G. Klecka. 2002. Optimizing Reductive Dechlorination in a High-Sulfate In Situ Bioremediation System. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds.), *Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. Battelle Press, Columbus, OH.
- Finn, P. S., A. Kane, J. Vidumsky, D.W. Major, & N. Bauer. 2003. In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents in Overburden and Bedrock Using Bioaugmentation. Abstract. Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Orlando, Florida, June 2-5.
- Fischer, N.M., T. Reed, C. Madsen, & T. Mascarenas. 2001. Dissolved Plume PCE Remediation Using a Combination of Zero-Valent Iron and Hydrogen Release Compound. I: Leeson, A., B.C. Alleman, P.J. Alvarez, & V.S. Magar (Eds.), *Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry*. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 73-78.
- Flynn, S.J., F.E. Löffler, & J.M. Tiedje. 2000. Microbial community changes associated with a shift from reductive dechlorination of PCE to reductive dechlorination of *cis*-DCE and VC, *Environ. Sci. Technol.*, 34:1056-1061.
- Fox, B.G., J.G. Borneman, L.P. Wackett, & J.D. Lipscomb. 1990. Haloalkene oxidation by soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3B – mechanistic and environmental implications. *Biochemistry*, 29:6419-6427.
- Fredslund, L., F. Ekelund, C.S. Jacobsen, & K. Johnsen. 2001. Development and Application of a Most Probable Number-PCR Assay to Quantify Flagellate Populations in Soil Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4): 1613-1618
- Gelhar, L.W., & M.A. Collins. 1971. General Analysis of Longitudinal Dispersion in Nonuniform Flow. *Wat. Res.*, 15:1511-1521.
- Gerritse, J., G. Kloetstra, A. Borger, G. Dalstra, A. Alphenaar, & J.C. Gottschal. 1997. Complete degradation of tetrachloroethene in couples anoxic and oxic chemostats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48:553-562.
- Gerritse, J., G. Kloetstra, L. Wiersum, P.A. Lawson, M.D. Collins, A. Alphenaar, & J.C. Gottschal, 1996a. Reductive dechlorination of chloroethenes or chlorophenols by two novel *Desulfitobacterium* spp.

- grown in batch and chemostat cultures. I: J. Lalucat & K.N. Timmis (Eds.), ***Biodegradation of organic pollutants. UIB-GBF-CSI-TUB Symposium***, p. 171. Palma de Mallorca, Spain.
- Gerritse, J., V. Renard, T.M.P. Gomes, P.A. Lawson, M.D. Collins, & J.C. Gottschal. 1996b. Desulfotobacterium sp strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols, ***Archives of Microbiology***, 165:132-140.
- Gillham, R.W., R.C. Starr, & D.J. Miller. 1990. A Device for In Situ Determination of Geochemical Transport Parameters. 2: Biochemical Reactions. ***Ground Water***, 28:858-862.
- Haas, P.E., P. Cork, C.E. Aziz & M. Hampton. 2000. In Situ Biowall Containing Organic Mulch Promotes Chlorinated Solvent Bioremediation. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), ***Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds***. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 71-77.
- Hageman, K.J., J.D. Istok, J.A. Field, T.E. Buscheck, & L. Semprini. 2001. In Situ Anaerobic Transformation of Trichlorofluoroethene in Trichloroethene-Contaminated Groundwater. ***Environ. Sci. Technol.***, 35:1729-1735.
- Haggerty, R., M.H. Schroth, & J.D. Istok 1998. Simplified Method of "Push-Pull" Test Data Analysis for Determining in situ Reaction Rate Coefficients. ***Ground Water***. 36:314-324.
- Hall S.H., S.P. Luttrell, & W.E. Cronin. 1991. A Method for Estimating Effective Porosity and Ground-Water Velocity. ***Ground Water***, 29:171-174.
- Harkness, M. R.; A.A. Bracco, M.J. Brennan Jr., K.A. DeWeerd, & J.L. Spivack. 1999. Use of Bioaugmentation to Stimulate Complete Reductive Dechlorination of Trichloroethene in Dover Soil Columns. ***Environ. Sci. Technol.***, 33(7):1100-1109.
- Harkness, M.R. 2000. Economic Considerations in Enhanced Anaerobic Biodegradation. In: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, and V.S. Magar (Eds), ***Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds***. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 9-14.
- Harms, W.D., K.A. Taylor, B.S. Taylor. 2000. HRC-Enhanced Reductive Dechlorination of Source Trichloroethene in an Unconfined Aquifer. In: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, and V.S. Magar (Eds), ***Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds***. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 295-302.
- Hartmans, S., & J.A.M. deBont. 1992. Aerobic vinyl chloride metabolism in ***Mycobacterium aurum li***. Appl. ***Environ. Microbiol.***, 58:1220-1226.
- Hartmans, S., J.A.M. deBont, J.Tamper, & K.Ch.A.M. Luyben. 1985. Bacterial degradation of vinyl chloride. ***Biotechnol. Lett.***, 7:383-388.
- He, J., K.M., Ritalahti, M.R. Aiello, F.E. & Loffler. 2003. Complete Detoxification of Vinyl Chloride by an Anaerobic Enrichment Culture and

- Identification of the Reductively Dechlorinating Population as a *Dehalococcoides* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:996-1003.
- He, J.Z., Y. Sung, M.E. Dollhopf, B.Z. Fathepure, J.M. Tiedje, & F.E. Löffler. 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites, *Environ. Sci. Technol.*, 36:3945-3952.
- Hendrickson, E.R., J.A. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, J.A. Payne, & L.W. Buonamici. 2002. Molecular Analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from Chloroethene-Contaminated Sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:485-495.
- Hendrickson, E.R., M.G. Starr, M.A. Elbersen, J.A. Payne, E. Mack, H.-B. Huang, M. McMaster, & D.E. Ellis. 2001. Using a Molecular Monitoring Approach to Monitor a Bioaugmentation Plot. I: Leeson, A., B.C. Alleman, P.J. Alvarez, & V.S. Magar (Eds.) Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 43-51.
- Henssen, M.J.C., A.W. van der Werf, S. Keuning, C. Hubach, R. Blokzijl, E. van Keuklen, B. Alblas, C. Haasnoot, H. Boender, & E. Meijerink. 2001. Engineered Full Scale Bioremediation of Chlorinated Ethenes. I: Leeson, A., B.C. Alleman, P.J. Alvarez, & V.S. Magar (Eds.), Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 73-78.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss, & A.J.B. Zehnder. 1998. *Dehalobacter restrictus gen. nov. and sp. nov.*, a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Archives of Microbiology*, 169:313-321.
- Holliger, C., C. Regeard, & G. Diekert. Dehalogenation by Anaerobic Bacteria. I: *Dehalogenation – Microbial Processes and Environmental Applications*. Häggblom, M.M. & Bossert, I.D. Kluwer Academic Publisher, USA, 2003.
- Holliger, C., G. Schraa, A.J.M. Stams, & A.J.B. Zehnder. 1993. A Highly Purified Enrichment Culture Couples the Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to Growth, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:2991-2997.
- Holmes, A., Govan, J., and R. Goldstein. 1998. Agricultural Use of Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia: A Threat to Human Health? *Emerging and Infectious Diseases*. 4(2) April-June
- Hristova, K.R., C.M. Lutenecker, & K.M. Scow. 2001. Detection and Quantification of Methyl tert-Butyl Ether-Degrading Strain PM1 by Real-Time Taqman PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(11):5154-5160.
- Istok, J.D., M.D. Humphrey, M.H. Schroth, M.R. Hyman, and K.T. O'Reilly. 1997. Single-well 'push-pull' test for in situ determination of microbial activities, *Ground Water*, 35(4):619-631
- ITRC/RTDF. 2003. Accelerated Bioremediation of Chlorinated Solvents – Short Course Handout Materials. Battelle Conference on In Situ and On-Site Bioremediation. Orlando, Florida. June 1, 2003.

- Isalou, M., B.E. Sleep, & S.N. Liss. 1998. Biodegradation of high concentrations of tetrachloroethene in a continuous flow column system, *Environ. Sci. Technol.*, 32:3579-3585.
- Janssen, D.B., A. Scheper, L. Dijkhuizen, & B. Witholt. 1985. Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, *Appl. Environ., Microbiol.*, vol. 49, no. 3, pp. 673-677.
- Jacobsen, T.H, C. Mossing. 2002. Hedeselskabet Miljø og Energi as. Pilotforsøg med stimuleret reduktiv deklorering ved tilsætning af HRC™, Jægersborg alle, Gentofte. ATV Vintermøde, 5.-6-. marts 2002.
- Johnsen, K., Ø. Enger, C.S. Jacobsen, L. Thirup, & V. Torsvik. 1999. Quantitative selective PCR of 16S rDNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* in soil hot spots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1786-1788.
- Jeffers, P.M., L.M. Ward, L.M. Woytowitch, & N.L. Wolfe. 1989. Homogeneous hydrolysis rate constants for selected chlorinated methanes, ethanes, ethenes, and propanes. *Environ. Sci. Technol.*, 23:965-969.
- Kaseros, V.B., B.E. Sleep, & D.M. Bagley. 2000. Column Studies of Biodegradation of Mixtures of Tetrachloroethene and Carbon Tetrachloride. *Wat. Res.*, 34(17):4161-4168.
- Kean, J.A., D. Graves, K. Bishop, E. Mott-Smith, & M. Lodato. 2002. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Kengen, S.W.M., C.G. Breidenbach, A. Felske, A.J.M. Stams, G. Schraa, & W.M. de Vos. 1999. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to *cis*-1,2-dichloroethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2312-2316.
- Krumholz, L.R. 1997. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. Nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *International J. Syst. Bacteriol.*, 47:1262-1263.
- Krumholz, L.R., R. Sharp, & S.S. Fishbain. 1996. A freshwater anaerob coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4108-4113.
- Langenhoff, A.A.M, A.A.M. Nipshagen, C. Bakker, J. Krooneman, & G. Visscher. 2001. Monitoring Stimulated Reductive Dechlorination at the Rademarkt in Groningen, The Netherlands. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 141-147.
- Lee, M.D., J.M. Thomas, R.C. Borden, P.B. Bedient, J.T. Wilson, & C.H. Ward. 1988. Bioremediation of Aquifers Contaminated with Organic Compounds. *CRC Critical Rev. Environ. Controls*, 18:29-89.
- Lee, M.D., R.J. Buchanan, & D.E. Ellis. 2000. Laboratory Studies Using Edible Oils to Support Reductive Dechlorination. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds),



Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 77-84.

- Leigh, D.P., C.D. Johnson, R.S. Skeen, M.G. Butcher, L.A. Bienkowski, & S. Granade. 2000. Enhanced Anaerobic In Situ Bioremediation of Chloroethenes at NAS Point Mugu. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 229-235.
- Lendvay, J., P. Adriaens, M. Barcelona, C. Lee Major, J. Tiedje, M. Dollhopf, F. Loeffler, B. Fathepure, E. Petrovskis, M. Gebhard, G. Daniels, R. Hickey, R. Heine, & J. Shi. 2001. Preventing Contaminant Discharge to Surface Waters: Plume Control with Bioaugmentation. I: Leeson, A., B.C. Alleman, P.J. Alvarez, & V.S. Magar (Eds.), Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 19-26.
- Lendvay, J.M., F.E. Löffler, M. Dollhopf, M.R. Aiello, G. Daniels, B.Z. Fathepure, M. Gebhard, R. Heine, R. Helton, J. Shi, R. Krajmalnik-Brown, C.L. Major, M.J. Barcelona, E. Petrovskis, J.M. Tiedje, & P. Adriaens. 2003. Bioreactive Barriers: A Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation for Chlorinated Solvent Remediation. *Environ. Sci. Technol.*, 37(7):1422-1431.
- Lesage, S., S. Brown, K. Millar, C.S. Mowder, T. Llewellyn, S. Forman, D. Peters, G. DeLong, D.J. Green, & H. McIntosh. 2002. Post-Treatment Biological Attenuation at a Site Contaminated with Mixed Chlorinated Solvents. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Litherland, S.T., D.W. Anderson, & B.A. Dinwiddle. 1999. Full-Scale Bioremediation at a Chlorinated Solvents Site: Project Update. I: A. Leeson & B.C. Alleman (Eds.), Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination. Battelle, Columbus, Ohio. pp. 157-163
- Little, C.D., A.V. Palumbo, S.E. Herbes, M.E. Lidstrom, R.L. Tyndall, & P.J. Gilmer. 1988. Trichloroethylene biodegradation by methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:951-956.
- Lovley, D.R., F.H. Chapelle, & J.C. Woodward. 1994. Use of Dissolved H<sub>2</sub> Concentrations to Determine the Distribution of Microbially Catalyzed Redox Reactions in Anoxic Groundwater (Vol 28, Pg 1205, 1994), *Environ. Sci. Technol.*, 28:1992.
- Lovely, D.R., & M.J. Klug. 1983. Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:187-192.
- Löffler F.E., Q. Sun, J. Li, J.M. Tiedje. 2000. 16S rRNA Gene-Based Detection of Tetrachloroethene-Dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4):1369-1374.

- Löffler, F.E., J.M. Tiedje, & R.A. Sanford. 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halorespiratory physiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4049-4056.
- MacDonald. T.R., and P.K. Kitanidis, "Biofouling Effects on In Situ TCE Bioremediation by Phenol Utilizers", in ***Bioremediation of Chlorinated Solvents***, R.E. Hinchee, A. Leeson, and L. Semprini (eds.), Battelle Press, Columbus, OH, 1995.
- Maierle, M.S. & J.L. Cota. 2001. Complete PCE Degradation and Site Closure Using Enhanced Reductive Dechlorination. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), *Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 149-156.
- Major, D.W., M.L. McMaster, E.E. Cox, B.J. Lee, E.E. Gentry, E. Hendrickson, E. Edwards, & S. Dworatzek. 2001. Successful Field Demonstration of Bioaugmentation to Degrade PCE and TCE to Ethene. I: Leeson, A., B.C. Alleman, P.J. Alvarez, & V.S. Magar (Eds.), *Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry*. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 27-33.
- Major, D.W., M.L. McMaster, E.E. Cox, E.A. Edwards, S.M. Dworatzek, E.R. Hendrickson, M.G. Starr, J.A. Payne, & L.W. Buonamici. 2002. Field Demonstration of Successful Bioaugmentation to Achieve Dechlorination of Tetrachloroethene to Ethene. ***Environ. Sci. Technol.***, 36(23):5106-5116.
- Major, D.; Edwards, E.; McCarty, P., Gossett, J.; Hendrickson, E. Frank Loeffler, Zinder, S., Ellis, D., Vidumsky, J., Harkness, M., Klecka, G., Cox, E. "Discussion of Environment vs. Bacteria or Let's Play, 'Name that Bacteria'" ***Ground Water Monitoring & Remediation***, 23(2):32-48.
- Manale F., Bradley F. Droy, Ph.D., and Russ Copeland, P.E., Catherine Creber, Gary Klecka, Ph.D. ***Paper 2B-37***, in: A.R. Gavaskar and A.S.C. Chen (Eds.), ***Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds—2002***. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds (Monterey, CA; May 2002). ISBN 1-57477-132-9, published by Battelle Press, Columbus, OH,
- Marnette, E.C.L., H. Tonnare, A. Alphenaar, & G.J. Groenendijk. 2001. Liner- A New Concept for the Stimulation of Reductive Dechlorination. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), *Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 297-303.
- Martin, J.P., K.S. Sorenson, L.N. Peterson, R.A. Brennan, C.J. Werth, R.A. Sanford, G.H. Bures, & C.J. Taylor. 2002. Enhanced CAH Dechlorination in a Low Permeability, Variably-Saturated Medium. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), *Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio.

- Martin, R.E., E.J. Bouwer, & L.M. Hanna. 1992. Application of Clean Bed Filtration Theory to Bacterial Deposition in Porous Media. *Environ. Sci. Technol.*, 26:1053-1058.
- Maymo-Gatell, X., I. Nijenhuis, & S.H. Zinder. 2001. Reductive dechlorination of *cis*-1,2-dichloroethene and vinyl chloride by "*Dehalococcoides ethenogens*", *Environ. Sci. Technol.*,35:516-521.
- Maymo-Gatell, X., T. Anguish, & S.H. Zinder. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2- dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogens*" 195, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3108-3113.
- Maymo-Gatell, X., Y.-T. Chien, J.M. Gossett, & S.H. Zinder. 1997. Isolation of a Bacterium that Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science* 276:1568-1571.
- Mazur, C.S., & W.J. Jones. 2001. Hydrogen concentrations in sulfate-reducing estuarine sediments during PCE dehalogenation. *Environ. Sci. Technol.*, 35:4783-4788.
- McCarty, P.L. & L. Semprini. 1994. Groundwater treatment for chlorinated solvents. I: *Handbook of Bioremediation*. R.D. Norris et al., eds., Lewis Publishers, Boca Raton, FL
- McCarty, P.L., M.N. Goltz, G.D. Hopkins, M.E. Dolan, J.P. Allan, B.T. Kawakami, & T.J. Carrothers. 1998. Full-Scale Evaluation of In Situ Cometabolic Degradation of Trichloroethylene in Groundwater through Toluene Injection. *Environ. Sci. Technol.* 32(1):88-100.
- McCarty, P. 1996. Biotic and Abiotic Transformations of Chlorinated Solvents in Ground Water. I: Symposium on Natural Attenuation of Chlorinated Organics in Ground Water, Dallas, Texas, September 11-13, 1996. US EPA. EPA/540/R-97/504, pp 5-9.
- McMaster, M., E. Hood, D. Major, C. LeBron, & J. Quinn. 2003. Evaluation of Bioaugmentation to Enhance DNAPL Dissolution at Multiple Field Sites. Abstract. Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Orlando, Florida, June 2-5.
- McMaster, M., E. Hood, D. Major, C. Lebron, & T. McHale. 2002. Evaluation of Bioaugmentation to Enhance PCE DNAPL Dissolution at Dover National Test Site. Abstract. SERDP/ESTCP Partners in Environmental Technology Symposium & Workshop. Washington, DC, December 3 – 5, 2002.
- Middeldorp, P.J.M., M.L.G.C. Luijten, B. A. van de Pas, M.H.A. van Eekert, A.J. M. Stams, S.W.M. Kengen, & G. Schraa. 1999. Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes. *Bioremediation Journal*, 3(3):151-169.
- Miljøstyrelsen 2000. Miljøprojekt, Nr 544. Naturlig nedbrydning af olie og chlorerede opløsningsmidler i grundvandet på Drejøgade 3-5. Teknologiprogrammet for jord- og grundvandsforurening. Af: Christensen, A.G. & C.R. Riis.
- Miljøstyrelsen 1996. nr. 20. Kemiske stoffers opførsel i jord og grundvand. Projekt om jord og grundvand. Af: Kjeldsen, P & T.H. Christensen.

- Miljøstyrelsen 2003a. Miljøprojekt, Nr 833. Oprensning af klorerede opløsningsmidler ved stimuleret reduktiv deklorerings - Jægersborg Allé, Gentofte. Teknologiprogrammet for jord- og grundvandsforurening. Af: Mossing, C. & P.L. Bjerg.
- Miljøstyrelsen. 2003b. Spildevand- og vandforsyningskontoret, Christian Ammitsøe, 2003. Brev af 15. august 2003 med svar på COWI's spørgsmål vedrørende tilsætning af bakteriekulturer til grundvand.
- Millar, K., S. Lesage, S Brown, C.S. Mowder, T. Llewellyn, S. Forman, D. Peters, G. DeLong, D.J. Green, & H. McIntosh. 2001. Biocide Application Prevents Biofouling of a Chemical Injection/Recirculation Well. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 333-340.
- Miller, E.G., G. Wohlfarth, & G. Diekert. 1996. Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.*, 166:379-387.
- Mohn, W.W. & J.M. Tiedje. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56:482-507.
- Morie, C.S, J. Greene, G.B. Page, & B. Ilgner. 2002. Tetrachloroethylene and Uranium Remediation Using IRZ. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds - 2002. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Morse, J.J., B.C. Alleman, J.M. Gossett, S.H. Zinder, D.E. Fennell, G.W. Sewell, & C.M. Vogel. 1998. A Treatability Test for Evaluating the Potential Applicability of the Reductive Anaerobic Biological In Situ Treatment Technology (RABITT) to Remediate Chloroethenes. Draft Technical Protocol. U.S. Department of Defense, Environmental Security Technology Certification Program.
- Murray, W., M. Dooley, & S. Koenigsberg. 2001. Enhanced Bioremediation of Chlorinated Solvents. Two Novel Methods for Enhancing Source Zone Bioremediation: Direct Hydrogen Addition and Electron Acceptor Diversion. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 197-204.
- Nakashima, M., X. Wu, R. Okada, & M. Nishigaki. 2002. Enhanced Bioremediation of a Site in Japan Contaminated with Chlorinated Solvents Using HRC Injection. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Neumann, A., H. Schotz-Maramatsu, & G. Diekert, 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.*, 139:388-396.
- Neumann, A., G. Wohlfarth, & G. Diekert. 1995. Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.*, 163:276-281.

- Newell, C.J., C.E. Aziz, P.E. Haas, J.B. Hughes, & T.A. Khan. 2001. Two Novel Methods for Enhancing Source Zone Bioremediation: Direct Hydrogen Addition and Electron Acceptor Diversion. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), *Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 19-26.
- Nielsen, R.B. & J.D. Keasling. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethene DNAPLs by a culture enriched from contaminated groundwater, *Biotechnology and Bioengineering* 62: 160-165.
- Nielsen, P.H., P.L. Bjerg, P. Nielsen, P. Smith, & T.H. Christensen. 1996. In Situ and Laboratory Determined First Order Degradation Rate Constants of Specific Organic Compounds in an Aerobic Aquifer. *Environ. Sci. Technol.*, 30:31-37.
- Nielsen, P.H., T.H., Christensen, H.-J. Albrechtsen, and R.W. Gillham, 1996b. Performance of the in-situ microcosm technique for measuring the degradation of organic chemicals in aquifers, *Ground Water Monitoring and Remediation*, 16(1):130-140.
- Nyer, E.K., F. Payne, & S. Suthersan, 2002. Environment vs. bacteria or let's play 'name that bacteria'. *Ground Water Monitoring and Remediation* 23:36-45.
- Oldenhuis, R., R.L.J.M. Vink, D.B. Janssen, & B. Witholt. 1989. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, Nov. 1989:2819-2826.
- Peeples, J.A., J.M. Warburton, I. Al-Fayyomi, & J. Haff. 2001. Enhanced Reductive Dechlorination of Ethenes: Large-Scale Pilot Testing. I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), *Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 165-171.
- Quinton, G.E., D.E. Ellis, S.H. Shoemaker. 1997. "Cost Evaluation of Anaerobic Bioremediation Versus Other In Situ Technologies," in *In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4*, Battelle Press, Columbus, OH, 1997
- Ras N.J.P., Bioclear b.v., 9704 CG Groningen, Holland. Telefonisk samtale, februar 2004.
- Railsback, R., G. S. Hardy, & R. Gillespie. 2002. Enhanced Reductive Dechlorination Results in Conditional Closure at Texas Dry Cleaner Facility. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds.), *Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. Battelle Press, Columbus, OH.
- Reinhard, M., S. Shang, P.K. Kitanidis, E. Orwin, G.D. Hopkins, & C.A. Lebron. 1997. In Situ Biotransformation under Enhanced Nitrate- and Sulfate-Reducing Conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 31:28-36.
- Richardson, R.E., V.K. Bhupathiraju, D.L. Song, T.A. Goulet, & L. Alvarez-Cohen. 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that

- reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques, *Environ. Sci. Technol.*, 36:2652-2662.
- Rijnaarts, H.H.M., W. Norde, E.J. Bouwer, J. Lyklema, & A.J.B. Zehnder. 1996. Bacterial Deposition in Porous Media: Effects of Cell Coating, Substratum Hydrophobicity, and Electrolyte Concentration. *Environ. Sci. Technol.*, 30(10):2877-2883.
- Roberts, P.V., G.D. Hopkins, D.M. Mackay, & L. Semprini. 1990. A Field Evaluation of *In situ* Biodegradation of Chlorinated Ethenes. Part 1. Methodology and Field Site Characterization. *Ground Water*, 28(4):591-604.
- Robinson J.A. & J.M. Tiedje. 1984. Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H<sub>2</sub> under resting and growing conditions. *Arch. Microbiol.*, 137:26-32.
- Sandefur, C.A., K. Parrett, & K.A. Lopus. 2002. Bioremediation of a PCE Plume at a Dry Cleaner Site. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. TJR tjekker
- Scholz-Muramatsu, H., A. Neumann, M. Messmer, E. Moore, & G. Diekert. 1995. Isolation and Characterization of *Dehalospirillum Multivorans* Gen-Nov, Sp-Nov, A Tetrachloroethene-Utilizing, Strictly Anaerobic Bacterium. *Archives of Microbiology* 163:48-56.
- Schumacher, T.T., W.A. Bow, & J.P. Chitwood. 2000. A Field Demonstration Showing Enhanced Reductive Dechlorination Using Polymer Injection. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 15-22.
- Seagren, E.A., B.E. Rittman, & A.J. Valocchi. 1994. Quantitative Evaluation of the Enhancement of NAPL-Pool Dissolution by Flushing and Biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, 28:833-839.
- Semprini, L, G.D. Hopkins, P.V. Roberts, D. Ggalic, & P.L. McCarty. 1991. A field-evaluation of insitu biodegradation of chlorinated ethenes. 3. Studies of competitive-inhibition. *Ground Water*, 29:239-250.
- Semprini, L, P.V. Roberts, G.D. Hopkins, & P.L. McCarty. 1990. A field-evaluation of insitu biodegradation of chlorinated ethenes. 2. Results of biostimulation and biotransformation experiments. *Ground Water*, 28:715-727.
- Sewell, G.W., B.H. Wilson, J.T. Wilson, D.H. Kampbell, & S.A. Gibson. 1991. Reductive dechlorination of tetrachloroethene and trichloroethene in fuel spill plumes, in *Chemical and Biochemical Detoxification of Hazardous Waste*, Vol. II, J.A. Glaser, ed., Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Skoff, D.E., J.S. Holmes, & D. Peterson. 2002. Time-Release Electron Donor Application in a Low-Permeability PCE-Contaminated Aquifer. I: A.R.

- Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio.
- Skubal, K.L., M.J. Barcelona, & P. Adriaens. 2001. An assessment of natural biotransformation of petroleum hydrocarbons and chlorinated solvents at an aquifer plume transect, *Journal of Contaminant Hydrology*, 49:151-169.
- Smatlak, C.R., J.M. Gossett, & S.H. Zinder. 1996. Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture, *Environ. Sci. Technol.*,30:2850-2858.
- Snodgrass, M.F., & P.K. Kitanidis. 1998. A Method to Infer in Situ Reaction Rates from Push-Pull Experiments. *Ground Water*, 36:645-650.
- Stover M.A. 1993. MS Thesis; Cornell University, Ithaca, NY.
- Stucki, G., U. Krebsler, & T. Leisinger. 1983. Bacterial growth on 1,2-dichloroethane. *Experientia*, 39, pp. 1271-1273.
- Sun, B.L., B.M. Griffin, H.L. Ayala-del-Rio, S.A. Hashsham, & J.M. Tiedje. 2002. Microbial dehalorespiration with 1,1,1-trichloroethane, *Science*, 298:1023-1025.
- Tandoi, V., T.D. Distefano, P.A. Bowser, J.M. Gossett, & S.H. Zinder. 1994. Reductive Dehalogenation of Chlorinated Ethenes and Halogenated Ethanes by A High-Rate Anaerobic Enrichment Culture, *Environ. Sci. Technol.*28:973-979.
- Taylor, S.W., C.R. Lange, and E.A. Lesold. 1997. "Biofouling of Contaminated Groundwater Recovery Wells: Characterization of Microorganisms", *Ground Water*, 35(6):973-980, 1997.
- Thomas, J.H. and C.H. Ward. 1989. In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. *Environ. Sci. Technol.* 23(7):760-766.
- Uchiyama, H., T. Nakijima, O. Yagi, & T. Nakaharat. 1992. Role of heterotrophic bacteria in complete mineralization of trichloroethylene by *Methylocystis* sp strain-M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3067-3071.
- U.S. Air Force. 1998. Aerobic Cometary In Situ Bioremediation Technology Guidance Manual and Screening Software User's Guide. Center for Environmental Excellence, Environmental Restoration Division. Brooks Air Force Base, Texas.  
<http://en.afit.af.mil/env/insitubio.htm>
- U.S. EPA. 2000a. Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications. EPA 542-R-00-008. <http://www.epa.gov/tio/pub.htm>
- U.S. EPA. 2000b. Applicability of RCRA Section 3020 to *In situ* Treatment of Ground Water.  
<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/ca/resource/guidance/remwaste/references/pol-mem3.pdf>

- U.S. EPA. 2000c. Case Study #6. Pilot and Full-Scale Anaerobic In-Situ Reactive Zone at an Abandoned Manufacturing Facility, Emeryville, California. In: Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents. EPA 542-R-00-008. pp. A-49:A-55
- U.S. EPA. 2000d. Case Study #8. Bioaugmentation (Accelerated Anaerobic Bioremediation) Field Demonstration at Area 6 of the Dover Air Force Base, Dover Delaware. In: Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents. EPA 542-R-00-008. pp. A-42:A-48
- Utkin, I., D.D. Dalton, & J. Wiegel. 1995. Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:346-351.
- Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, et al. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans sp nov.* *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1188-200.
- Vogel, T.M., & P.L. McCarty. 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinylchloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1080-1083.
- Vogel, T.M., & P.L. McCarty. 1987. Abiotic and biotic transformations of 1,1,1-trichloroethane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 21:1208-1213.
- Vogel, T.M. 1994. Natural bioremediation of chlorinated solvents. I: *Handbook of Bioremediation*. R.D. Norris et al., eds., Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Vogel, T.M., C.S. Criddle & P.L. McCarty. 1987. Transformation of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 21:722-736.
- Wiedemeier, T.H., H.S. Rifai, C.J. Newell, & J.T. Wilson. 1999. *Natural Attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Wild, A., R. Hermann, & T. Leisinger. 1996. Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. *Biodegradation*, 7:507-511.
- Wilson, J.T., & B.H. Wilson, 1985. Biotransformation of Trichloroethylene in Soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:242-243.
- Wilson, R.D., D.M. Mackay, and K.M. Scow. 2002. In situ MTBE biodegradation supported by diffusive oxygen release. *Environ. Sci. Technol.* 36:190-199.
- Wu, W.M., J. Nye, M.K. Jain, & R.F. Hickey. 1998. Anaerobic dechlorination of trichloroethylene (TCE) to ethylene using complex organic materials. *Water Research*, 32:1445-1454.
- Yager, R.M., S.E. Bilotta, C.L. Mann, & E.L. Madsen. 1997. Metabolic adaptation and in situ attenuation of chlorinated ethenes by naturally



- occurring microorganisms in a fractured dolomite aquifer near Niagara Falls, New York, *Environ. Sci. Technol.*, 31: 3138-3147.
- Yang, Y., & P.L. McCarty. 2000a. Biologically Enhanced Dissolution of Tetrachloroethene DNAPL. *Environ. Sci. Technol.*, 34(14): 2979-2984.
- Yang, Y. & P.L. McCarty. 2000b. Biomass, Oleate, and Other Possible Substrates for Chloroethene Reductive Dehalogenation. *Bioremediation Journal*. 4(2):125-133.
- Yang, Y., & P.L. McCarty. 2002. Comparison Between Donor Substrates for Biologically Enhanced Tetrachloroethene DNAPL Dissolution. *Environ. Sci. Technol.*, 36(15):3400-3404.
- Yang, Y., & P.L. McCarty. 2003. Response to Comment on "Comparison Between Donor Substrates for Biologically Enhanced Tetrachloroethene DNAPL Dissolution." *Environ. Sci. Technol.*, 37(11):2620-2621.
- Yang, Y.R., & P.L. McCarty. 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture, *Environ. Sci. Technol.*, 32: 591-3597.
- Young R.G. & J.M. Gossett. 1997. Effect of environmental parameters and concentrations on dechlorination of chloroethenes. Præsenteret på The Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, LA.
- Yu, S., & L. Semprini. 2002. Dechlorination of PCE DNAPL with TBOS Using a Binary Mixed Culture. I: A.R. Gavaskar & A.S.C. Chen (Eds.), Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus, OH.
- Zahiraeslamzadeh, Z.M., & J.C. Bensch. 2000. Enhanced Bioremediation Using Hydrogen Release Compound (HRC) in Clay Soils. I: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, B.C. Alleman, & V.S. Magar (Eds), Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 237-244. Also I: V.S. Magar, D.E. Fennell, J.J. Morse, B.C. Alleman, & A. Leeson (Eds), Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents. Battelle Press, Columbus Ohio. pp. 221-228.
- Zahiraeslamzadeh **Z. M. & J.C.** Bensch, 2001. Enhanced bioremediation using Hydrogen Release Compound (HRC) in clay soils. Bioremediation Field Case studies.

## 9.2 Referencer for henvendelse til myndigheder og rådgivere

Miljøstyrelsen. 2003. Spildevand- og vandforsyningskontoret, Christian Ammitsøe, 2003. Brev af 15. august 2003 med svar på COWI's spørgsmål vedrørende tilsætning af bakteriekulturer til grundvand.

Københavns Amt. 2003. Telefonsamtale med Peder Johansen, Københavns Amt. August 2003

Frederiksborg Amt. 2003: Telefonsamtale med Mads Ertebjerg Nielsen, Frederiksborg Amt. August 2003

Vejle Amt. 2003. Telefonsamtale med Rolf Johnsen, Vejle Amt. August 2003.

SKB. 2003. E-mail korrespondance med Bert Satijn, SKB (den hollandske miljøstyrelse, [www.skbodem.nl](http://www.skbodem.nl)), juli-august 2003. Bert.Satijn@Cur.nl.

Bioclear. 2003. E-mail korrespondance med Maurice Henssen, Bioclear BV ([www.bioclear.nl](http://www.bioclear.nl)), juli-august 2003. Henssen@bioclear.nl.

Tauw BV. 2003. E-mail korrespondance med Frank Volkering, Tauw BV ([www.tauw.nl](http://www.tauw.nl)), juli-august 2003. Fvo@tauw.nl.

Fyns Amt. 2003. Telefonsamtale med Lone Frederiksen, Fyns Amt. September 2003

Storstrøms Amt. 2003. Telefonsamtale med Brian Tang Vestergård, Storstrøms Amt. September 2003

Geomatrix. 2003. Telefonsamtale med Peter Bennett, Geomatrix Consultants. September 2003

Arcadis. 2003. E-mail korrespondance med Jeff Burdick, Arcadis - Holland, September 2003

Tabel 9.1 Firmaer som er kontaktet i forbindelse med projektet

Land	Firma	Kontaktperson	Bemærkning
USA	Geomatrix Consultants, <a href="http://www.geomatrix.com">www.geomatrix.com</a>	Peter Bennett	Har givet oplysninger om bl.a. elektrondonorer, bioaugmentation, felterfaringer. Har fremsendt 4 artikler (grå litteratur)
	Coler & Colantonio, Inc., <a href="http://www.col-col.com">www.col-col.com</a>	Ingen	Ingen respons
Holland	Bioclear BV, <a href="http://www.bioclear.ne">www.bioclear.ne</a>	Maurice Henssen	Har udarbejdet en rapport som er vedlagt som bilag F.
	Arcadis, <a href="http://www.arcadis-us.com">www.arcadis-us.com</a>	Jeff Burdick, Arcadis – Holland	Har givet overordnede oplysninger, bl.a. med behov for bioaugmentation.
	Tauw BV, <a href="http://www.tauw.com">www.tauw.com</a>	Frank Volkering	Har givet oplysninger om myndighedsforhold.