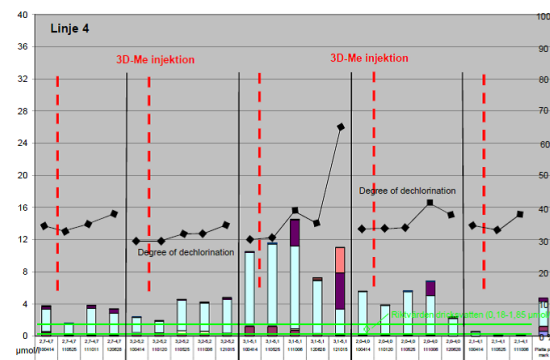
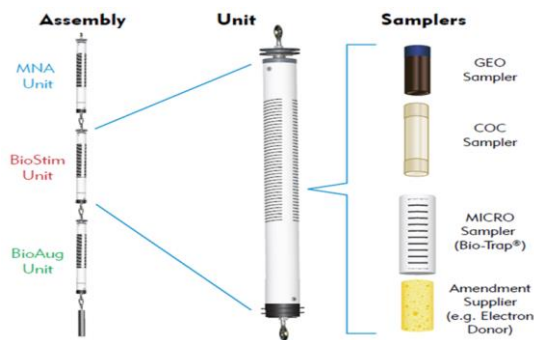


Tillsats av mikroorganismer och kolkälla i områden förorenade med klorerade lösningsmedel

Erfarenheter och rekommendationer

Lennart Larsson, Ole Stubdrup, Helena Branzén, Lars Davidsson



SGI Publikation 10

Hänvisa till detta dokument på följande sätt:
Larsson, L, Stubdrup, O, Branzén, H & Davidsson, L
(2014). Tillsats av mikroorganismer och kolkälla i
områden förorenade med klorerade lösningsmedel.
Erfarenheter och rekommendationer. Statens geo-
tekniska institut, SGI. Publikation 10, Linköping

Diarienummer: 1.1-1206-0404

Uppdragsnummer: 14887

Beställning:

Statens geotekniska institut
Informationstjänsten
581 93 Linköping
Tel: 013-20 18 04
E-post: info@swedgeo.se

Ladda ner publikationen som PDF
www.swedgeo.se



Statens geotekniska institut

Tillsats av mikroorganismer och kolkälla i områden förorenade med klorerade lösningsmedel

Erfarenheter och rekommendationer

Lennart Larsson
Ole Stubdrup
Helena Branzén
Lars Davidsson

SGI Publikation 10

Linköping 2014

Förord

Föroreningar kan medföra risker för människors hälsa och vår miljö. I Sverige har vi miljö kvalitetsmål som anger inriktningen för miljöarbetet för att minska dessa risker. Det finns ett stort antal förorenade områden i landet. Utredningar av vilka risker ett förorenat område kan innebära för människors hälsa eller miljön och hur man vid behov kan minska riskerna genom efterbehandling, är en viktig del av miljömålsarbetet. Statens geotekniska institut (SGI) har det nationella ansvaret för forskning, teknikutveckling och kunskapsuppbyggnad inom förorenade områden. Syftet är att SGI ska medverka till att höja kunskapsnivån samt öka saneringstakten så att miljö kvalitetsmålen nås.

Som ett led i detta ingår att förmedla kunskap om det arbete som utförs vid SGI till olika intressenter, såsom tillsynsmyndigheter, universitet och högskolor, konsulter, analyslaboratorier, problemägare och entreprenörer med flera.

Föreliggande publikation är författad med avsikt att sprida kunskap om undersökning av mikrobiell nedbrytning av klorerade etener. Innehållet i rapporten är därför delvis på grundläggande nivå men innehåller samtidigt diskussioner av karaktär ”överkurs”. Meningen är att innehållet ska vara tillgängligt för både mottagare av undersökningsresultat men också kunna användas av utövarna av saneringstekniken.

Uppdragsledare för projektet har varit Lennart Larsson vid SGI. I projektgruppen har även Ole Stubdrup och Helena Branzén vid SGI ingått. Lars Davidsson, WSP Environmental AB, har utfört fältundersökningarna samt bidragit med information avseende resultat från tidigare och pågående undersökningar på den aktuella platsen. Lars har även granskat den tekniska delen av rapporten. Michael Pettersson, SGI, har varit kvalitetsgranskare i projektet.

Undertecknad har beslutat att ge ut publikationen.

Linköping i mars 2014

David Bendz
Forskningschef

Innehållsförteckning

Sammanfattning	9
Läsanvisningar	11
1 Bakgrund	12
2 Syfte och mål	13
3 Information och underlag för bedömning av resultat	14
3.1 Dekloreringsgrad	14
3.2 Molfraktioner	15
3.3 Isotopanalyser, CSIA	15
3.4 Molekylärbiologiska verktyg	16
3.5 Standard Bio-Trap	19
3.6 Avancerad Bio-Trap.....	20
4 Områdesbeskrivning	24
4.1 Geologi	25
4.2 Föroreningssituation	27
4.3 Effekt av förstärkt självrening	28
5 Förutsättningar inför SGI-projektet	31
5.1 Inledning	31
5.2 Undersökningar av föroreningar, isotoper och mikrobiologi.....	31
6 Utförande i aktuellt projekt	37
6.1 Inledning	37
6.2 Analysprogram.....	38
7 Resultat och utvärdering	40
7.1 Hållförändringar och dekloreringsgrader	40
7.2 Förändring i molfraktioner.....	47
7.3 Isotopanalyser	49
7.4 PLFA.....	55
7.5 Standard Bio-Trap	58
7.6 Avancerad Bio-Trap.....	59
7.7 Sammantaget utfall.....	65
8 Diskussion	72
8.1 Erfarenheter med avancerad Bio-Trap	72
8.2 Erfarenheter med qPCR	75
8.3 Erfarenheter med PLFA.....	77
8.4 Erfarenheter med isotopundersökningar	78
8.5 Osäkerhet i dekloreringsgrad för klorerade etener	79
8.6 Preliminär bedömning av nedbrytningsstadium i källa och plym.....	81
8.7 Behov av bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering?	82
8.8 Kostnader för Bio-Trap och CSIA.....	83
9 Slutsatser och rekommendationer	85
9.1 Slutsatser.....	85
9.2 Generella rekommendationer	85
9.3 Platsspecifika rekommendationer.....	87
Referenser	89
Förklaringar	93

Bilagor

1. Teoretisk information om isotopanalyser och beräkningar
2. Bio-Trap – DNA Sampling Protocol (Microbial Insights, Inc.)
3. Bio-Trap – RNA Sampling Protocol (Microbial Insights, Inc.)
4. DHC Interpretation guide (Microbial Insights, Inc.)
5. Phospholipid Fatty Acid Analysis. Interpretation Guidelines (Microbial Insights, Inc.).
6. Analysprotokoll Standard Bio-Trap. Protocol number 028JI (Microbial Insights, Inc.)
7. Supply List – Deployment. Bio-Trap / avancerad Bio-Trap (Microbial Insights, Inc.)
8. Analysprotokoll avancerad Bio-Trap: SITE LOGIC Report Bio-Trap *In Situ* Microcosm Study. Microbial Insights, USA. 029JI Report Revised 11/26/2012
9. Analysprotokoll isotopanalyser, CSIA (Microseeps, Inc.)

Sammanfattning

Åtskilliga områden i Sverige, vanligtvis belägna i stadsmiljöer, bedöms vara förorenade med klorerade lösningsmedel som är toxiska för människa och miljö. En *in situ* baserad saneringsmetod som vid flera tillfällen visat sig vara kostnadseffektiv är förstärkt självrening av naturligt pågående reduktiv deklorering via tillförsel av kolkälla (biostimulering) och ibland också mikroorganismer (bioaugmentation). Metoden är relativt ny i Sverige men har använts i betydligt större utsträckning internationellt.

SGI har i samarbete med WSP tillämpat och utvärderat några undersökningsmetoder som eventuellt kan ersätta, eller komplettera, mer omfattande pilottester i fält. Försöken har utförts i ett område där man sedan tidigare påbörjat saneringsåtgärder med förstärkt självrening och där man önskat klargöra effekter av en eventuellt framtida bioaugmentation och/eller utökad biostimulering. I och med att en *in situ* sanering redan inletts i området, fanns möjlighet till jämförelse med tidigare analysresultat. SGI:s samverkansprojekt har därför tagit utgångspunkt i befintliga resultat från WSP men utökat provtagnings- och analysunderlaget med en ny typ av passiv provtagare (s.k. avancerad Bio-Trap) från Microbial Insights Inc. USA, som tillåter en samtidig utvärdering av både biostimulering och bioaugmentation.

I projektet har följande undersökts:

- 1) Gensekvenser för att karakterisera det mikrobiella samhället med fokus på reduktiv dekloreringsförmåga.
- 2) Isotopsammansättning för direkt bevis på nedbrytning.
- 3) Effekter på det mikrobiella samhället respektive på nedbrytning av klorerade etener beroende på om ytterligare kolkälla (biostimulering) och/eller mikroorganismer (bioaugmentation) tillförs.

Utöver ovan har även ingått att preliminärt utvärdera effekter av tidigare genomförd biostimulering. Fältarbetet inom föreliggande projekt genomfördes av WSP under sensommaren–hösten 2012.

Det aktuella projektområdet är beläget i Falkenberg och består av ett industriområde med pågående verksamhet. Föroreningen har sitt ursprung från aktiviteter under 1930–1970-talet. WSP har sedan 2009 utfört flertal markundersökningar i området. Utredningarna har visat förekomst av minst ett, förmodligen två, källområden med innehåll av trikloreten och dess nedbrytningsprodukter, samt visat ett spridningsområde som sträcker sig söderut i riktning mot bostadsområde. Vid undersökning 2009 kunde ställvis indikation på nedbrytningsaktivitet påvisas. I oktober 2010 utfördes, under ledning av WSP, biostimulering i föroreningens källområden genom injektion av kolkälla. Denna biostimulering följdes upp av WSP med kontrollprovtagningar fram till föreliggande projekt.

Som en utveckling av WSP:s tidigare undersökningar i det aktuella området har föreliggande projekt fokuserat utvärdering av speciella undersöknings- och analysmetoder, bl.a. mikrobiella gensekvensanalyser (s.k. qPCR-analyser) och analyser av mikrobiella cellmembraner (s.k. PLFA-analyser) samt $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopanalyser. Vidare har passiva provtagare av typen standard Bio-Trap och speciell s.k. avancerad Bio-Trap testats och utvärderats, den senare för bedömning av effekt av eventuell framtida bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering.

Varje avancerad Bio-Trap bestod av seriekopplade enheter med avgränsade testceller (mikroklimat) i kontakt med grundvattnet. En del av dessa celler var laddade med mikroorganismer och/eller fermenterbara kolkälla. Utförda analyser var primärt kopplade till avancerad Bio-Trap provtagarna för att finna effektskillnader mellan möjlig framtida biostimulering och/eller bioaugmentation.

Generellt sett bedöms avancerad Bio-Trap ha stor potential men de som nu testades gav inte entydiga svar. Avancerad Bio-Trap är utrustad med vertikalt avgränsande bafflar mellan tre olika delenheter

(MNA/kontrollenhet, BioStim och BioAug). Erhållna resultat kan eventuellt tyda på vertikal spridning/påverkan mellan dessa olika enheter. Det skulle i så fall kunna bero på otäta bafflar eller vertikal sidopåverkan i grundvattenrörets filter. Avancerad Bio-Trap bedöms inte vara fullt utvecklad för att motstå negativ inbördes påverkan från dess olika avgränsade delar.

Standard Bio-Trap, som endast består av mikrobiell enhet (del av MNA-enhet), bedöms däremot kunna ge tillförlitliga resultat. Dessa kan dock inte ge information om effekt av tänkt biostimulering eller bioaugmentation som avancerad Bio-Trap är avsedd att ge. Vid bedömning bör även hänsyn tas till att varje testad avancerad Bio-Trap är signifikant dyrare än standard Bio-Trap.

qPCR-analyser kan ge viktigt bevisunderlag för enskilda provpunkters mikrobiella potential att bryta ned förorening. En eventuell nackdel är att man idag bara känner till ett mindre antal gensekvenser som har förmåga att producera enzymer som genom reduktiv deklorering fullständigt kan deklorera klorerade etener till eten. Forskning inom detta område går dock raskt framåt.

PLFA-analyser ger en bild av den "levande" biostrukturen vid provtagningstillfället. Analyser av PLFA vid olika tidpunkter kan ge en god förståelse för dynamiken i området. PLFA visar dock inte förekomst av de specifika mikroorganismer som krävs för att uppnå reduktiv deklorering, eller fullständig nedbrytning av VC till eten. PLFA-analyser bör därför endast ses som ett komplement till qPCR-analyser.

Isotopanalyser är potent verktyg för att visa att haltförändringar beror av nedbrytning och inte av utspädning, fastläggning, m.m. Analyserna kan därtill ge information om omfattningen av mikrobiell nedbrytning av ursprungsföreningen samt total mikrobiell nedbrytning. Information om reduktiv deklorering av enskilda mellanprodukter (t.ex. *cis*-DCE, VC) kan dock vara svårtolkad då dessa både bildas och bryts ned. Med tillräckligt många prover kan dock kolisotoper verifiera att en fullständig nedbrytning sker.

Läsanvisningar

Föreliggande publikation är författad med avsikt att sprida kunskap om undersökning av mikrobiell nedbrytning av klorerade etener. Innehållet i rapporten är därför delvis på grundläggande nivå men innehåller samtidigt diskussioner av karaktär ”överkurs”. Meningen är att innehållet ska vara tillgängligt för både mottagare av undersökningsresultat men också kunna användas av utövarna av saneringstekniken.

Rapporten är indelad i *nio kapitel*.

Kapitel 1. Ger kort bakgrund till projektet.

Kapitel 2. Beskriver projektets syfte och mål.

Kapitel 3. Ger information om olika verktyg och analyser som kan användas för att finna bevis på biologisk nedbrytning av förorening i grundvatten. I kapitlet beskrivs beräkning och utvärdering av dekloreringsgrad, isotopkvoter utifrån analys av kolisotoper samt utvärdering av analys av speciella gener i utvalda bakterier. Därtill beskrivs nytt verktyg i form av passiv provtagare och hur denna kan användas för att få information om behov och effekt av eventuellt framtida nedbrytningsstimulerande tillsatser till den förorenade akvifären. Kapitlet riktar sig till den som vill få information om nya kommersiella verktyg för bedömning av pågående, och framtida potentiella, nedbrytning av klorerade etener i en förorenad akvifär.

Kapitel 4. Beskriver geologi, föroreningssituation och effekt av tidigare utförd biostimulering i grundvattnet på fastigheten Rampen 36, Falkenberg. Biostimuleringen utfördes hösten 2010, dvs. före aktuellt projekt, under ledning av WSP Environmental AB genom tillsats av utvald kolkälla i det förorenade källområdets grundvatten. Kapitlet riktar sig till den som vill få information om vilken effekt som kan uppnås två år efter fullskaleinjektion av kolkälla i kloretenförorenad akvifär.

Kapitel 5. Beskriver de kemiska och mikrobiella förutsättningar som förelåg i fastighetens grundvatten inför det aktuella projektet.

Kapitel 6. Ger information om det undersöknings- och analysprogram som ingått i projektet.

Kapitel 7. Beskriver de resultat som erhållits fram till projektets slutförande. Kapitlet riktar sig till den som vill informera sig om hur resultat från de nya verktygen kan användas.

Kapitel 8. Diskuterar erfarenheter som erhållits med de nya undersöknings- och analysverktygen. Kapitlet riktar sig till problemägare, entreprenörer och konsulter samt statliga och kommunala handläggare av förorenade områden.

Kapitel 9. Beskriver slutsatser samt ger både generella och platsspecifika rekommendationer, utifrån erfarenheter från projektet. Detta kapitel vänder sig till alla som har koppling till undersökning eller sanering av akvifärer, förorenade främst med klorerade etener.

1 Bakgrund

Åtskilliga områden i Sverige, vanligtvis belägna i stadsmiljöer, bedöms vara förorenade med klorerade lösningsmedel. Lösningsmedlen, som i allmänhet består av klorerade etener, är toxiska för människa och miljö och kräver inte sällan någon form av saneringsåtgärd. Föroreningarnas egenskaper försvårar åtgärder då de är tyngre än vatten samtidigt som de är relativt vattenlösliga. Detta innebär att de strävar nedåt i marken och kan transporteras långa sträckor med grundvattnet. I de fall det är möjligt (i princip då föroreningen är belägen ovan grundvattenytan och där åtkomsten med grävmaskiner är möjlig) brukar uppgrävning tillämpas. Åtgärdstekniker för djupare liggande föroreningar, eller föroreningar under byggnader, är tekniskt mer krävande och antalet möjliga åtgärdsmetoder är mer begränsat. I stadsmiljöerna utgör bebyggelse ett särskilt hinder mot uppgrävning och man får istället förlita sig på *in situ* metoder för sanering. Flera *in situ* metoder har dock hittills visat sig vara begränsande i saneringseffekt, i den meningen att de inte genererat tillräcklig saneringsgrad inom acceptabel tid och till rimlig kostnad. Under det senaste decenniet har det visat sig att mikrobiell nedbrytning, under lämpliga förutsättningar, kan svara upp mot ett flertal av de krav på saneringsgrad, tidsförlopp och ekonomi som ställs.

I allmänhet är de naturliga förutsättningarna inte tillräckligt gynnsamma för att nedbrytning av klorerade lösningsmedel ska ske av sig självt i tillräcklig takt. Nedbrytningsförloppet kan dock påskyndas genom att man förbättrar de platsspecifika förutsättningarna, och på så vis förstärker självreningen. De viktigaste faktorerna som avgör om nedbrytning av klorerade etener ska ske är närvaro, *in situ*, av:

- kolkälla/kolkällor som kan fermenteras i tillräcklig omfattning,
- mikroorganismer som kan fermentera kolkällorna så att väte bildas,
- tillräckligt med mikroorganismer av typer som är specialiserade på nedbrytning, s.k. reduktiv deklorer, av de befintliga klorerade föroreningarna, via nyttjandet av det parallellt bildade vätet från fermentation av tillsatt kolkälla.

Eftersom metoden förstärkt självrening är relativt ny i Sverige har den hittills tillämpats på fåtal områden. I dessa fall har man generellt förlitat sig på enbart tillsats av kolkälla (biostimulering). Internationellt har man funnit att det ibland även finns behov av att tillföra speciella mikroorganismer (bioaugmentation) så att nedbrytningen påskyndas i tillräcklig grad. Bioaugmentation i en akvifär förorenad av klorerade etener har veterligen ännu inte utförts i fullskala i Sverige.

Beslut att använda biostimulering har hittills baserats på enkla analyser av kemiska parametrar i grundvattnet i ett undersökningsskede, och inte på undersökningar som visar platsspecifik effekt av en tänkt biostimulering. Vidare, om bioaugmentation trots allt har utförts i Sverige så har det troligen inte baserats på utfall av föregående fältmässiga undersökningar av platsspecifik effekt av en bioaugmentation.

Föreliggande projektet har utförts i samarbete med WSP på ett kloretenförorenat område i södra Sverige. Området har tidigare genomgått grundlig undersökning som utmynnat i en huvudstudie från WSP med tillhörande åtgärdsutredning. Utredningen föreslog förstärkt självrening genom tillsats av kolkälla, s.k. biostimulering, som primär åtgärd. Denna åtgärd realiserades hösten 2010 genom injektioner med 3DME (kolkälleblandning; Regenesys, 2012). Kontrollprovtagningar har därefter utförts vid tre tillfällen innan föreliggande undersökning. Dessa provtagningar visade att nedbrytning av trikloreten (TCE) och *cis*-dikloreten (*cis*-DCE) ökade efter injektionen men att ökad halt av en mer toxisk nedbrytningsprodukt, vinylklorid (VC), samtidigt erhöles i vissa delområden.

2 Syfte och mål

Projektet har som övergripande syfte att ta fram praktisk kunskap och erfarenheter som kan tillgodogöras av problemägare, entreprenörer och konsulter samt statliga och kommunala handläggare av förorenade områden i Sverige vid bedömning av en kloretenförorenad akvifers potential att genomgå förstärkt självrening.

Projektet har genomförts på en fastighet i Falkenberg i vars kloretenförorenade grundvatten det tidigare utförts biostimulering genom tillförsel *in situ* av kolkälla i avsikt att påskynda den biologiska nedbrytningen av föroreningarna.

Föreliggande projekts specifika syfte är att under 2012 undersöka effekten av denna biostimulering samt om tillsats av mikroorganismer (bioaugmentation) och/eller kompletterande tillsats av kolkälla kan ytterligare påskynda nedbrytningen av de klorerade etenerna. Syftet är därtill att undersöka om utgången av sådan eventuellt ytterligare tillsats kan relevant bedömas med en ny, och för ändamålet speciellt framtagen, provtagningsutrustning utan att reell fältinjektion av varken kolkälla eller mikroorganismer behöver utföras.

Målsättningen med projektet är att:

- undersöka hur genanalyser av befintliga mikroorganismer i akvifer med förmåga att reduktivt deklorera klorerade etener kan nyttjas för bedömning av den platspecifika mikrobiella potentialen för de önskade nedbrytningsförloppen,
- visa hur analys av föroreningarnas kolisotoper kan användas för att få direkt bevis på nedbrytning av föroreningarna,
- testa och utvärdera nytt passivt provtagnings sätt som kan avslöja ett kloretenförorenat områdes behov av, och respons på, möjlig framtida biostimulering och/eller bioaugmentation.
- ge rekommendationer baserat på de erfarenheter som gjorts vid biostimulering av ett kloretenförorenat grundvatten i Falkenberg.

Passiv provtagning, kopplad till biostimulering och bioaugmentation, har relativt nyligen kommersialiserats i USA. Den har oss veterligen ännu inte använts och utvärderats i Sverige. Strategin är intressant då den har potential att ersätta kostnadskrävande pilottester i fält under vilka fullskaliga injektioner av kolkälla och/eller mikroorganismer i annat fall kan behöva utföras. Därtill kräver vanligtvis sådana pilotfälttester anmälan enligt 28 § förordningen om miljöfarlig verksamhet och hälsoskydd vilket den nu föreslagna strategin inte kräver.

3 Information och underlag för bedömning av resultat

En viktig del vid kontroll av förstärkt självrening av klorerade etener är att finna bevis på att dekloreringen påskyndas i tillräcklig grad genom ”förstärkningen”, samt att en tillräckligt stor del av haltreduktion orsakas av nedbrytning och inte enbart av utspädning, fastläggning, m.m. Dessa bevis kan vara direkta eller indirekta och några vanliga verktyg, eller sätt, att ta fram sådana bevis ges i detta kapitel.

I kapitlet beskrivs generellt hur man kan beräkna dekloreringsgrad, visualisera förändring i molfraktioner av förorening över tid och hur man kan använda isotopanalyser av klorerade etener. Därtill ges generell information om olika molekylärbiologiska analysverktyg och biokemiska provtagare som kan användas med syfte att få indirekta bevis på förekomst och omfattning av den mikrobiella potentialen att bryta ned klorerade etener i ett grundvatten. Avsnittet om isotopanalyser ger enbart en kort övergripande beskrivning, för mer detaljer hänvisas till Bilaga 1.

3.1 Dekloreringsgrad

Dekloreringsgraden (DKG) är en samlingsparameter som ger ett mått på hur långt utvecklingen, i förhållande till ursprungsprodukterna, har gått avseende den totala dekloreringsprocessen. Ju högre procentuellt värde på parametern, desto mer av de högklorerade etenerna har reductivt deklorerats till lägre klorerade etener. Denna samlingsparameter baseras på, eller förutsätter, att nedbrytningen endast sker via reductiv deklorering. Är exempelvis den oxidativa nedbrytningen av VC betydande kan beräknad dekloreringsgrad ge missvisande resultat.

DKG för TCE som utgångs-/startförening beräknas enligt följande (Bjerg et al., 2006) (för PCE som utgångsförening, se SGF, 2011):

$$DKG(\%) = ([DCE] + 2 \cdot [VC] + 3 \cdot [Eten] + 3 \cdot [Etan]) / (3 \cdot ([TCE] + [DCE] + [VC] + [Eten] + [Etan])) \cdot 100$$

där

[X] = Molära koncentrationen i $\mu\text{mol/liter}$ av föreningen X = halt i mikrogram per liter ($\mu\text{g/l}$) av X, dividerat med molvikten ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) av X.

Enskilda klorerade eteners molvikt fås i tabellverk. Det är viktigt att alla aktuella klorerade etener samt eten och etan analyseras eftersom alla deras molära halter ingår i beräkningen av DKG.

Förutsatt att ursprungsförening till fullo bestod av TCE och allt detta TCE deklorerats till DCE så blir DKG = 33 %. Om DCE fullständigt deklorerats till VC, så blir DKG = 66 % och om alla klorerade etener deklorerats till eten/etan (dvs. om allt TCE deklorerats till DCE och allt detta DCE deklorerats till VC och allt detta VC deklorerats till eten/etan) blir DKG 100 % (Bjerg et al., 2006).

3.2 Molfraktioner

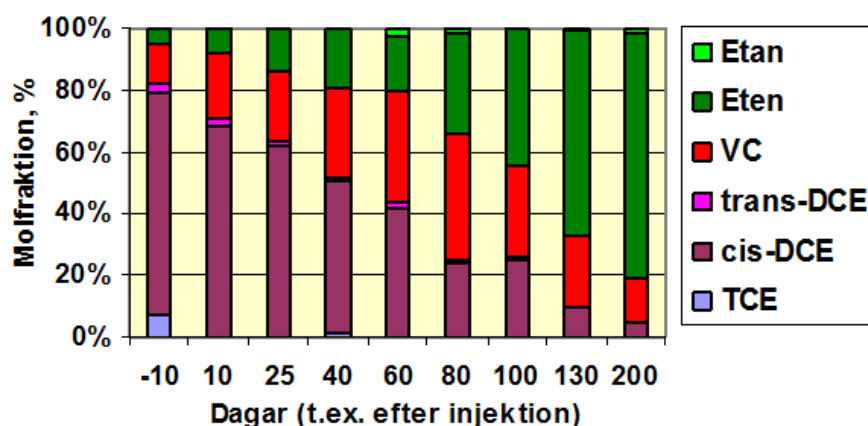
Utvecklingen av reduktiv deklorering av klorerade etener kan beskrivas med förändring av de olika etenernas molfraktioner och visualiseras med stapeldiagram. Molfraktionerna beräknas enligt följande exempel där TCE deklorerats till cis-DCE:

$$\text{Molfraktion, \% cis-DCE} = ([\text{cis-DCE}] / ([\text{TCE}] + [\text{DCE}] + [\text{VC}] + ([\text{Eten}] + [\text{Etan}]))) \cdot 100$$

där

[X] = Molära koncentrationen i µmol/liter av föreningen X, se Avsnitt 3.1.

Visualiseringen kräver analys av alla existerande klorerade etener, eten och etan samt molvikt för varje enskild förening. Speciellt lämplig är visualiseringen om den innefattar tidsberoende förändring av den reduktiva dekloreringen, exemplifierat i Figur 3.1. Med molfraktioner kan man även visa om det i % av totala molmassan bildats lika mycket VC som det försvunnit DCE samt, för mindre komplexa system, ställa upp massbalanser.



Figur 3.1 Tidsberoende förändringar av molfraktioner av TCE och nedbrytningsprodukter (via reduktiv deklorering) i en provpunkt nedströms t.ex. injektion.

3.3 Isotopanalyser, CSIA

Detta avsnitt ger en kort beskrivning av vad isotopanalyser av klorerade etener kan användas till. Avsnittet syftar till att ge underlag till de analysresultat som presenteras i senare delen av rapporten. Läsare som önskar fördjupad information med beräkningsexempel hänvisas till Bilaga 1.

Ämnesspecifik isotopanalys (CSIA, compound specific isotope analysis) är en analysmetod som mäter förhållandet av naturligt stabila isotoper av ämnen som ingår i föreningar. CSIA kan användas för att få information om bl.a. nedbrytning av aktuella föreningar.

Organiska kolbaserade föreningar, som t.ex. klorerade etener, innehåller kol. Kol består naturligt av olika isotoper. Majoriteten av dessa isotoper i t.ex. klorerade etener är i form av isotopen ^{12}C , medan ett fåtal är istället i form av isotopen ^{13}C . ^{12}C är en s.k. lätt isotop medan ^{13}C är tung isotop.

Nedbrytning av klorerade etener via mikrobiell reduktiv deklorering innebär att den kemiska bindningen mellan kolatomen och kloratomen bryts upp, varefter kloratomen byts ut mot en väteatom som binds till kolatomen. Det har visat sig att under denna mikrobiella nedbrytning så bryts bindningar till ^{12}C avsevärt

lättare än bindningar till ^{13}C . Nedbrytning av en klorerad eten resulterar härav i att kvarvarande förorening med tiden får en övervikt av molekyler med tunga isotoper, medan dess nedbrytningsprodukter får en övervikt av lättare isotoper. Ju längre som nedbrytningen av en ursprungsförening, t.ex. TCE, har gått desto högre relativ halt av ^{13}C (relativt till ^{12}C) hos kvarvarande TCE-molekyler. Detta har på senare tid fått ökad användning bl.a. vid undersökning av hur stor andel av en haltminskning som är orsakad av nedbrytning, och inte av utspädning, fastläggning, gasavgång, m.m.

Förhållandet mellan kolisotoperna ^{13}C och ^{12}C i en förening kallas internationellt för ratio (kvot) och betecknas δ . Denna kvot beräknas enligt (US EPA, 2008):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [((^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PROV}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}) / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}] \cdot 1000$$

Förhållandet $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}$ är ett internationellt standardvärde som motsvarande förhållande $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PROV}}$ i aktuell förening/prov relateras till. $\delta^{13}\text{C}$ anges i miljondelar och rapporteras i ‰.

Av ekvationen ovan fås att reduktiv deklorering av en spilld förorening, t.ex. TCE, resulterar i högre värde (minskat negativt värde) på $\delta^{13}\text{C}$ för kvarvarande TCE. Exempelvis, ett värde på $\delta^{13}\text{C} = -15 \text{‰}$, jämfört med $\delta^{13}\text{C} = -30 \text{‰}$, i båda fallen för provtaget TCE i t.ex. två olika provpunkter, visar att ursprunglig TCE i det förra fallet (-15 ‰) har brutits ned betydligt mer än i det senare fallet (-30 ‰).

Isotopdata kan idag användas både för kvalitativ bestämning och för att få kvantitativ information om nedbrytningen. Tolkning av isotopdata med avsikt att förutsäga kvantitativ omfattning av nedbrytning över tid eller rum utgår vanligtvis från ekvationer som ges i Bilaga 1.

3.4 Molekylärbiologiska verktyg

Mikroorganismer är i allmänhet encelliga och klassificeras antingen som prokaryoter (t.ex. bakterier) eller eukaryoter (t.ex. svampar). De består huvudsakligen av de fyra makromolekylerna proteiner, nukleinsyror, lipider och polysackarider. De tre första är i fokus vid molekylärbiologiska undersökningar.

Ett begränsat spektrum av mikroorganismer kan bryta ned klorerade etener genom reduktiv deklorering (och andra kan t.ex. bryta ned mellan- och låg-klorerade etener oxidativt). Exempelvis kan vissa arter av *Dehalococcoides* (förkortas DHC) reduktivt bryta ned PCE (perkloret) och TCE och andra kan bryta ned DCE och VC. Det är dock idag få kända mikroorganismer (med fastställda artnamn) som kan deklorera klorerade etener hela vägen från PCE (eller TCE) ned till eten.

Namn på mikroorganismer brukar anges först med genusnamn och därefter med dess s.k. artpitet. Exempelvis, för *Dehalococcoides ethenogenes*, som kan bryta ned VC till eten, är *Dehalococcoides* genusnamnet och *ethenogenes* artpitetet. Dessa två namn tillsammans motsvarar organismens artnamn (Vetbact, 2013). Det kan ibland vara svårt att fastställa/identifiera artpitetet. Om man funnit att en bakterie med förbestämt genusnamn har en specifik egenskap, t.ex. att utföra reduktiv deklorering av TCE, men dess artpitet inte klarlagts brukar man benämna denna *Dehalococcoides* sp. (sp. förkortning för "species"; *Dehalococcoides* sp. betecknar ospecificerat *Dehalococcoides*). Om flera olika *Dehalococcoides*, vars artpiteter inte är fastställda, har en gemensam egenskap, anges dessa med spp. (t.ex. *Dehalococcoides* spp.). Ibland anges att olika stammar av bakterier har vissa egenskaper. Stam är undergrupp i en art. Exempelvis är stammen *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 den idag enda kända i stammen *ethenogenes* som kan deklorera PCE hela vägen ned till eten. Optimalt pH för dess tillväxt är pH6,8–pH7,5 (Microbial Insights, 2013; Fennell et al., 2004; Maymo-Gatell et al., 1997). Enligt Smits et al. (2011) har även *Dehalococcoides* sp. strain FL2, identifierats att kunna utföra fullständig deklorering av PCE till eten. Det finns dock andra *Dehalococcoides* som deklorerar klorerade etener till eten men i de fallen endast med utgångsförening DCE eller VC.

Molekylärbiologiska verktyg (MBT) används för att undersöka närvaro av mikrobiell status och potentiell eller aktuell nedbrytningsaktivitet i ett prov. Verktygen kan vara gen-, protein-, lipid-, och/eller isotopbaserade. Det senare gäller analys av kolisotoper i mikrobernas celler och inte i föroreningen som sådan (beskrivet i föregående avsnitt). Verktygen kan användas för att bedöma potentialen för, och utfallet av, saneringsstrategier kopplade till bl.a. förstärkt självrening av klorerade etener. Utfallet kan ge information om eventuell nödvändighet att tillföra utvalda mikroorganismer (bioaugmentation) till en akvifär eller hur den mikrobiella statusen i en akvifär är eller ändras med olika saneringssätt (tillsats av kolkälla, näringsämnen, m.m.).

Exempel på verktyg för att undersöka reduktivt deklorerande mikroorganismer är qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Med detta kan närvaro, och antal, av kända deklorerande mikroorganismer samt specifika potentiella, eller aktiva, gensekvenser som kan kopplas till deklorering, mätas i plats-specifika fältprov. Gensekvenser i en mikroorganism, med potential att koda för produktion av enzymer i organismen som kan utföra en eller flera nedbrytningssteg av t.ex. klorerade etener, analyseras i mikroorganismernas DNA. För att veta om dessa gensekvenser för tillfället är aktiva (påslagna) för produktion av dessa enzymer så undersöks de i mikroorganismernas RNA. Ännu bättre hade varit om man direkt kunde analysera aktivt enzym. Hittills finns dock begränsade möjligheter att analysera själva enzymet (proteinbaserad MBT), så vanligtvis förlitar man sig på DNA- eller RNA-analyserna (proteinbaserad MBT för reduktiv deklorering är dock på frammarsch).

I det fall qPCR fokuserar på speciella gener i DNA erhålls svar på frågan ”föreligger det genetisk potential att bilda enzym som kan bryta ned förorening?”. qPCR som fokuserar på RNA ger svar på frågan ”föreligger det reell genetisk aktivitet och därmed aktiv produktion av enzym som i sin tur bryter ned förorening?”. RNA är, i motsats till DNA, det sista steget innan produktion av enzymet (när produktion av enzym ska utföras kopieras den dubbelsträngade DNA-molekylen till en enkelsträngad RNA molekyl som transporteras till plats där enzymet ska produceras). RNA-generna är mer kortlivade än DNA-generna och mikroorganismerna producerar endast enzym som omedelbart används. Detekteras RNA med aktuell gen så är det en indikation på att produktion av enzymet är påslaget. Detekteras specifika gener i DNA så innebär det alltså att det föreligger potential för motsvarande nedbrytning men inte nödvändigtvis att motsvarande enzymer produceras.

Analys av RNA kräver kortare tid mellan provtagning och analys än analys av DNA, varför qPCR-analyser för att undersöka mikroorganismer i ett fältprovtaget grundvatten vanligtvis fokuserar på DNA. RNA analys ger den bästa indikationen på viss aktivitet men eftersom RNA bryts ned snabbare än DNA kan RNA-informationen lättare förloras om tiden mellan provtagning och analys är lång (RNA: iskyt prov max 24 timmar; DNA: iskyt prov max 2 dygn, Bilaga 3; Bilaga 2). DNA-analys har använts i föreliggande fall (två dygns transporttid mellan fältprovtagning i Sverige och mottagning på lab i USA).

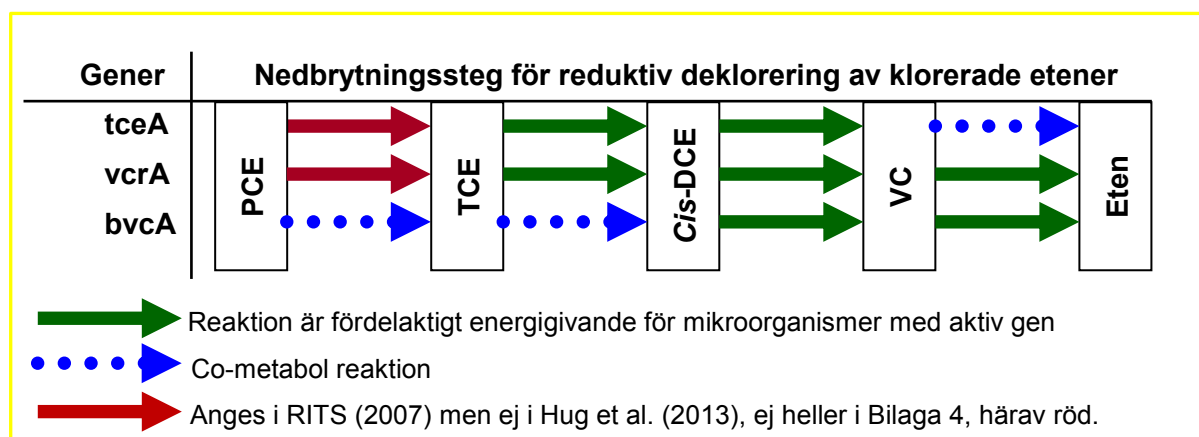
qPCR-analyser ger kvantitativa (vissa laboratorier anger semi-kvantitativa) resultat avseende antal mikroorganismer per enhet (t.ex. ml, mg) som har en specifik gensekvens. Därtill kan man få information om organismen som sådan. En specifik sträng i mikroorganismens gener kan avslöja vilken/vilka organismer som finns i ett prov. Kvantifiering (eller semi-kvantifiering) av denna sträng med genuttryck som enbart finns i *Dehalococcoides* spp. talar alltså om (i vissa fall ungefär) hur många bakterier, som har gener som endast motsvarar detta genusnamn, det finns i t.ex. per ml prov.

Några vanliga gensekvenser som analyseras med qPCR och som är kopplade specifikt till mikrobiell reduktiv deklorering av klorerade etener betecknas *pceA*, *tceA*, *vcrA* och *bvcA*. De är alltså kända för att koda för produktion av enzymer som kan bryta ned bl.a. olika klorerade etener, Tabell 3.1. I Figur 3.2 beskrivs det schematiskt för de gensekvenser som endast detekterats i *Dehalococcoides*. Orsaken till att endast *cis*-DCE anges är att de flesta mikroorganismer, som deklorerar TCE, bildar *cis*-DCE och i betydligt mindre utsträckning *trans*-DCE. Det senare har ansetts främst producerats via abiotiska processer. Det bör dock noteras att vissa mikrobiella kulturer under vissa förhållanden kan bilda mer av *trans*-DCE än *cis*-DCE (Griffin et al., 2004).

Tabell 3.1 Förklaring till gensekvenserna pceA, tceA, vcrA och bvcA (Bilaga 4; Hug et al, 2013; Lee et al., 2006; Chang et al., 2012; Spormann, 2011; Furukava et al., 2005, Fung et al., 2007).

Gen	Nedbrytning och mikroorganism	Gentolkning
pceA	Gen som kodar för produktion av enzym som utför reduktiv deklorering av PCE -> TCE. Har deklarerats i bl.a. <i>Dehalobacter</i> sp., <i>Geobacter</i> sp., <i>Sulfurospirillum</i> sp., <i>Desulfitobacterium</i> sp. strain Y51, <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> strain 195.	Detektering av pceA indikerar potential för deklorering av PCE. I <i>Dehalococcoides</i> synes den endast fokusera på PCE -> TCE men det finns indikationer på att pceA i andra bakterier även utför TCE -> cis-DCE.
tceA	Gen som kodar för produktion av enzym som utför reduktiv deklorering av främst ^{1/} TCE -> cis-DCE -> VC. Den finns i en del <i>Dehalococcoides</i> sp. (DHC sp.), t.ex. strain 195 och strain FL2. tceA är inte någon universal gen i DHC. Den synes inte finnas i andra mikroorganismer som kan reduktivt deklorera TCE (t.ex. <i>Dehalobacter</i>).	Detektering av tceA ger indikation på att det föreligger potential för deklorering av TCE. Frånvaro av denna gen omöjliggör dock inte potential för reduktiv deklorering av TCE. pceA och andra, ännu ej kartlagda, gener kan ev. föreligga som troligtvis också kan koda för produktion av enzymer som deklorerar TCE till cis-DCE.
bvcA	Gen som kodar för produktion av en typ av vinylklorid reduktas-enzym som utför reduktiv deklorering av främst ^{1/} cis-DCE -> VC -> eten. Den finns i <i>Dehalococcoides</i> sp. strain BAV1 (DHC-BAV1).	Närvaro indikerar potential för reduktiv deklorering av bl.a. VC till eten. Frånvaro av både bvcA och vcrA (se nedan) indikerar att VC har betydande potential att ackumuleras.
vcrA	Gen som kodar för produktion av en typ av vinylklorid reduktas enzym som utför reduktiv deklorering av främst ^{1/} TCE -> DCE -> VC -> eten. Den finns t.ex. i <i>Dehalococcoides</i> sp. strain VS och strain GT.	Närvaro indikerar potential för reduktiv deklorering av både TCE, DCE och VC. Frånvaro av både bvcA (se ovan) och vcrA indikerar att VC har betydande potential att ackumuleras.

^{1/}Figur 3.2 ger förklaring till "främst".



Figur 3.2 Tre gensekvenser hittills kartlagda endast i *Dehalococcoides* spp. som kodar för produktion av enzym som kan användas för angivna nedbrytningssteg (modifierad från ESTCP, 2011; RITS, 2007).

De fyra gensekvenserna i Tabell 3.1 kodar alltså för produktion av enzym av typen reduktiva dehalogena-ser och generna finns i *Dehalococcoides* spp (pceA har identifierats inte enbart i *Dehalococcoides*). År 2008 var sex olika stammar av *Dehalococcoides* sp. identifierade som hade minst en av dessa gensekven-ser (Lee et al., 2008). Det ger säkrare resultat avseende potential för deklorering att analysera gensekven-serna än mikroorganismerna som sådana. Van der Zaan et al. (2010) fann bl.a. att antalet *Dehalococci-oides* (analyserat via antalet specifika gener) i grundvattenprov huvudsakligen var kopplat till halten löst DOC i vattnet. Däremot var antalet vcrA främst kopplat till halter av VC och andra klorerade etener me-

dan *bvcA*, och speciellt *tceA*, var mer kopplade till högre redox än för *vcrA*. Man drog slutsatsen att analys av framför allt *vcrA* bättre avspeglar VC deklorering än analys av *Dehalococcoides* sp.

Det ska tilläggas att vanligtvis undersöks förekomst av generna *tceA*, *bvcA* och *vcrA* (alla kopplade till *Dehalococcoides*), men om dessa då inte detekteras så innebär det inte att PCE och/eller TCE inte kan dekloreras. Det är inte ovanligt att PCE- eller TCE-föreningade akvifärer uppvisar deklorering utan att dessa gener föreligger men dekloreringen har då vanligtvis avstannat vid främst *cis*-TCE. Om dock någon/några av dessa tre gener detekteras i DNA så ger det en indikation på att det finns potential för deklorering av *cis*-DCE och framför allt av VC. Observera alltså att deklorering av PCE och TCE kan utföras av ett relativt stort antal olika mikroorganismer medan deklorering av framför allt VC hittills endast har befunnits kunna utföras av vissa *Dehalococcoides*.

Det finns även en annan typ av MBT-analys. Den är inte genbaserad utan istället lipidbaserad och förkortas PLFA (phospholipid fatty acid). PLFA (fettsyror) utgör huvudkomponenter i mikroorganismernas cellmembran. Med denna typ av MBT analyseras tre nyckelaspekter i det mikrobiella samhället, nämligen levande biomassa, samhällets sammansättning och metabolisk status. De individuella fettsyrorna skiljer sig åt främst beroende på vilka organismer som är närvarande. PLFA kan härav hjälpa till att bestämma hur mycket biomassa som finns i ett prov (vanligtvis antal celler/gram eller celler/ml av prov) samt vilka generella typer av mikroorganismer (t.ex. proteobakterier vid aerob nedbrytning av vanliga kolväten) som närvarar i provet. Sammansättningen av de analyserade fettsyrorna är emellertid ospecifik, dvs. den ger ingen information om specifika föroreningsnedbrytande mikrobiella populationer.

3.5 Standard Bio-Trap

Undersökning av den mikrobiella statusen i ett grundvatten kan utföras på flera olika sätt. Ett sätt är att ta vattenprover och analysera. För att erhålla information om eventuella förändringar orsakade av t.ex. tillförsel av kolkälla och/eller av utvalda mikroorganismkulturer, behövs sådan provtagning utföras både före och vid flertal tillfällen efter dessa aktiviteter. Provtagning av grundvatten görs i fält och analyseras direkt på laboratorium. Det ger statusen vid provtagningsögonblicket.

Ett annat sätt att undersöka förändringar i mikrobiell aktivitet i grundvatten är mikrokosmstudier i laboratorieskala. Testerna görs på upptaget plats specifikt grundvatten i vilket förändringar över tid undersöks. Emellertid är det svårt att i laboratorieskala fullt ut imitera alla föränderliga fullskalefaktorer varvid resultaten ofta korrelerar dåligt till reella förhållanden i fält.

Ett tredje sätt är att utföra undersökningar i grundvatten i fält med s.k. Bio-Trap. De vanligaste är s.k. standard Bio-Trap men på senare tid har även s.k. avancerad Bio-Trap kommit ut på marknaden (beskrivs i efterföljande avsnitt).

Standard Bio-Trap är en passiv provtagare som placeras i grundvattenrör under 30-90 dagar. Den används bl.a. i klorerade etenföreningade akvifärer för att undersöka mikrobiella kulturer i akvifären och deras potential att bryta ned föreningar över tid. Den är avsedd att ersätta vanliga upprepade vattenprovtagningar för mikrobiella undersökningar. De flesta mikroorganismer i vatten föredrar att sätta sig på ytor istället för att vara fritt flytande/simmande. Standard Bio-Trap erbjuder stor ytarea för mikroorganismerna att kolonisera på och bilda biofilmer. Den möjliggör minimering av den variabilitet av mätvärden över tid som vanligtvis kan vara signifikant vid traditionella vattenprovtagningar. Ytterligare en fördel med metoden är att detta passiva provtagningsätt kan ge information om både de spatiala och tidsberoende förändringar hos de mikrobiella samhällena i grundvattnet, vilket inte alltid kan tydliggöras i vanliga grundvattenprov. Standard Bio-Trap används vanligen vid den inledande karaktäriseringen av ett förorenat grundvatten samt vid efterföljande rutinundersökningar för att:

- kvantifiera specifika mikroorganismer (t.ex. *Dehalococcoides*) och olika gensekvenser kopplade till önskad nedbrytning av förorening
- utvärdera potential för naturlig självrening
- jämföra mikrobiella populationer i olika provpunkter i ett områdes grundvatten
- undersöka förändringar av mikrobiella samhällen som kan följa av i fält utförd förstärkt självrening (t.ex. genom tillsats i akvifären av kolkälla).

Standard Bio-Trap består av en unik provtagningsmatris, s.k. Bio-Sep[®]-enhet, utvecklad i samarbete med University of Tulsa och University of Tennessee, båda USA. Enheten består av speciella kulor/pärlor, Ø 2-4 mm, innehållande dels materialet Nomex[®] och dels aktivt kolpulver. Innehållet i varje enhet har stor total ytarea, ~600 m²/g. När provtagaren sänks ned i det förorenade grundvattnet sorberas både förorening och befintliga näringsämnen. Detta ger därefter en fastbädd *in situ* för befintliga mikroorganismer att kolonisera. Efter att denna passiva provtagare suttit i grundvattnet 30-90 dagar (beroende på typ av provtagare och platspecifik situation, rådgör med leverantör) tas den upp för analys. DNA, RNA och/eller fosfolipid fettsyror (PLFA) kan extraheras från kulorna/ pärlorna och analyseras med qPCR-teknik (i föreliggande fall med CENSUS metoden som är en patenterad metod från Microbial Insights, 2011) och/eller med PLFA-metod för utvärdering av det mikrobiella samhället. Instruktioner kopplade till DNA visavi de typer av passiva provtagare som testats i föreliggande projekt ges i Bilaga 2 (motsvarande för RNA ges i Bilaga 3).

Standard Bio-Trap kan användas fristående eller ingå som separat del i s.k. MNA-enhet i avancerad Bio-Trap som har används, tillsammans med vanliga standard Bio-Trap, i föreliggande projekt. Observera att varje Bio-Trap ger begränsad rumsmässig (för det grundvatten den sitter i) och tidsmässig (för det tidsintervall den är utplacerad) information. En akvifär med klorerade etener kan uppvisa stor rums- och tidsmässig, kemisk som mikrobiell, variation varvid utvärdering kan vara starkt beroende av placering, tidsintervall och antal Bio-Trap.

3.6 Avancerad Bio-Trap

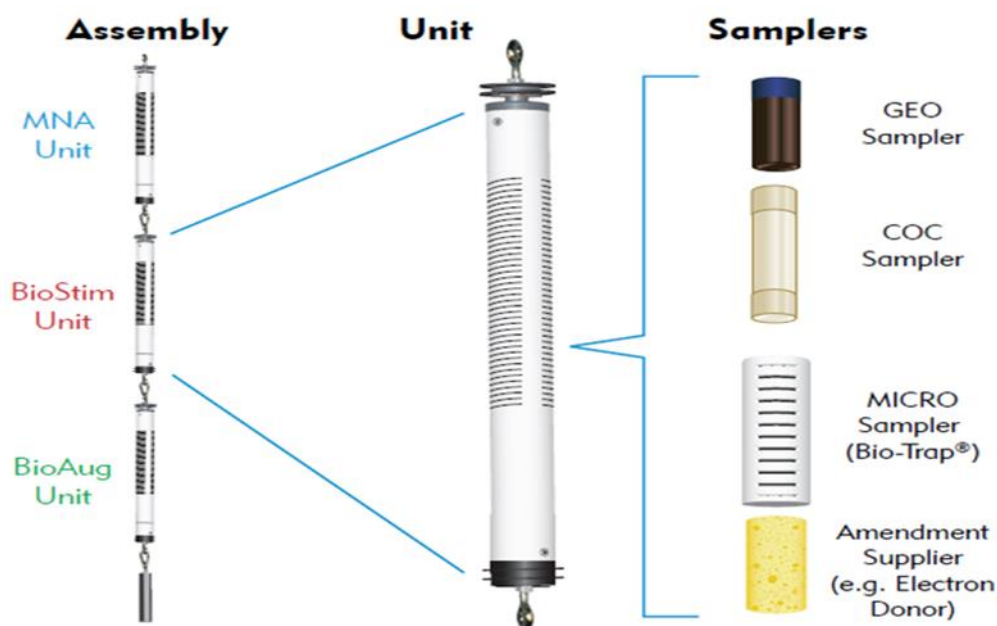
Utöver standard Bio-Trap har i föreliggande projekt testats så kallad avancerad Bio-Trap. Veterligen är det första gången som avancerad Bio-Trap har testats i Sverige.

Avancerad Bio-Trap är ett passivt provtagningsystem som sänks ned i grundvattenrör, placerat i förorenad akvifär. De bör sitta i grundvattnet, liksom vanlig standard Bio-Trap i 30-90 dagar (konsultera leverantör). Resultat erhållna med avancerad Bio-Trap har som målsättning att kunna användas för att svara på frågor huruvida framtida biostimulering (för reduktiv deklorering motsvarar det tillförsel *in situ* av fementerbar kolkälla) och/eller bioaugmentation (tillsats av mikroorganismer) är till fördel i en akvifär som i föreliggande fall är förorenad med klorerade etener som genomgår reduktiv deklorering. Detta kan alternativt göras t.ex. med aktivt pilottest där kolkälla och/eller mikroorganismer injekteras direkt *in situ*. Fördelen med avancerad Bio-Trap är alltså att den inte kräver fullskalig injektion av kolkälla och/eller av mikroorganismer för att ge information om vad sådana injektioner skulle kunna resultera i. Detta gör att avancerad Bio-Trap har potential att vara attraktiv ur både kostnads- och tidsynpunkt när man vill utvärdera eventuell bionedbrytning som en efterbehandlingsmetod.

Avancerad Bio-Trap består av tre enheter, kallade MNA-, BioStim- och BioAug-enhet. Varje enhet består dels av en vanlig standard Bio-Trap och dels av en eller flera separata delenheter. En av dessa delenheter kan t.ex. innehålla sorbent för klorerade etener och/eller sorbent för geokemiska ämnen. BioStim-enheten har därtill en delenheter som kan laddas med enbart kolkälla medan BioAug-enheten har delenheter som kan laddas med enbart mikroorganismer eller med både kolkälla och mikroorganismer om så önskas (vilket är fallet i föreliggande studie). I motsats till BioStim- och BioAug-enheterna innehåller MNA-enheten inga enheter för kolkälla eller mikroorganismer.

De tre enheterna i avancerad Bio-Trap är skilda från varandra enligt Figur 3.3. Enheterna är kopplade vertikalt i serie med mellanliggande avgränsningar (mellan enheterna och mot omgivning). Vid jämförelse av utfallet från MNA-enheten ("bakgrunds-enhet") och BioStim-enheten och/eller BioAug-enheten ger BioStim-enheten information om effekt på nedbrytning av förorening vid tillsats av fermenterbar kolkälla. BioAug-enheten ger information om vilken effekt som kan erhållas om tillsats av mikroorganismer görs. Om den även innehåller en delenheter för kolkälla kan den ge information om effekt av tillsats av både mikroorganismer och kolkälla.

I Figur 3.3 beskrivs sammansättningen av avancerad Bio-Trap med de tre enheterna och förklaras närmare i det följande samt i Bilaga 7. Instruktioner ges i Bilaga 2 (alternativt i Bilaga 3). Därtill ges fältexempel i Sublette et al. (2011; 2010).



Figur 3.3 Sammansättning av avancerad Bio-Trap-enhet (Sublette et al., 2010).

MNA-enheten är till del en standard Bio-Trap (som vanligt avsedd för att undersöka mikrobiell status). Därtill innehåller den en delenheter innehållande sorbent för klorerade etener och vid behov en delenheter/sorbent för geokemiska ämnen. Om MNA-enheten kombineras med minst en av de ytterligare enheterna angivna nedan så är MNA-enheten en kontrollenhet i avancerad Bio-Trap. Resultat från enheten används alltså för kontroll/jämförelse med resultat från nedanstående enheter/paket.

BioStim-enheten består delvis av en MNA-enhet och delvis av en enhet som är laddad med förbestämd, platsspecifik lämplig kolkälla. BioStim-enheten är speciellt designad med syfte att klarlägga huruvida framtida tillsats av utvald kolkälla kan stimulera tillväxt av, i akvifären befintliga, deklorerande mikroorganismer samt påskynda nedbrytningen.

BioAug-enheten är speciellt designad med syfte att klarlägga om tillsats av utvalda mikroorganismer kan påskynda nedbrytningen av de närvarande klorerade etenerna. Enheten består, förutom av en MNA-enhet, av en del som är laddad med en blandning av kommersiellt tillgängliga mikroorganismer, kända för att kunna deklorera klorerade etener. Sammansättningen av denna mix bestäms i förväg, platsspecifikt. Därtill kan BioAug-enheten bestå av en kolkälledel för att stimulera tillväxt av de mikroorganismer som BioAug-enheten är laddad med. Med enheten undersöks alltså hur ett tillskott av valda mikroorganismer i en tänkt fullskala *in situ* (med eller utan tillsats av kolkälla) kan påverka/öka nedbrytningen. Om man, efter upptag, finner lägre föroreningshalter av ursprungsförening och/eller högre halter av nedbrytningsprodukter i någon av BioStim- och BioAug-enheterna, jämfört med i MNA-enheten, så indikerar detta att motsvarande metod kan vara effektivare jämfört med att bara låta rådande situation pågå.

Jämförelse av analyserna av de geokemiska enheterna visar om motsvarande enhetsmetod t.ex. förbättrar de geokemiska förhållandena (t.ex. lägre redoxförhållanden för reduktiv deklorering). Jämförelse av utfallet från analys av de mikrobiella delarna i enheterna kan visa huruvida motsvarande metod, som den enskilda enheten är vald att motsvara, stimulerar tillväxt av organismer kapabla att bryta ned förorening. Om dessa ökat, samtidigt som nedbrytning av förorening ökat och geokemiska förhållanden förbättrats så är motsvarande åtgärdsmetod fördelaktig.

Avancerad Bio-Trap ger möjligheter att jämföra och kvantitativt utvärdera kemiska, geokemiska och mikrobiella data mellan de enskilda enheterna i ett och samma grundvattenrör, utifrån vad BioStim och BioAug platsspecifikt designas för. Det kan alltså svara på frågan om behandling A (t.ex. injektion av kolkälla) och/eller behandling B (t.ex. injektion av mikroorganismer) kan signifikant förstärka den naturliga nedbrytningen av befintlig förorening i akvifären, relativt utfallet att inte göra något alls (MNA-/kontroll-enheten).

På samma sätt som angivits för standard Bio-Trap ovan gäller att varje avancerad Bio-Trap ger information om just den punkten den är placerad i. Eftersom en kloretenförorenad akvifär kan uppvisa stor rums- och tidsmässig, kemisk som mikrobiell, variation blir utvärdering av resultaten från avancerad Bio-Trap beroende av placering, design och antal.

Den typ av avancerad Bio-Trap som användes i föreliggande projekt bestod av ovan beskrivna tre enheter, varav en var laddad med utvald kolkälla och en annan med utvalda mikroorganismer och kolkälla. I föreliggande fall bestämdes att variera kolkälla i enskilda avancerad Bio-Trap provtagare placerade i olika utvalda grundvattenrör, se Avsnitt 6.1.

Avancerad Bio-Trap kan laddas med stort urval av kolkällor (t.ex. HRC[®], EOS[®], laktat), och/eller mikroorganismer och/eller oorganiska näringsämnen (t.ex. nitrat, sulfat) och/eller med föreningar med olika isotopsammansättningar. Målsättningen är att på något sätt finna bevis på, och eventuellt behov av stimulans för, platsspecifik biologisk nedbrytning. Nedan ges några vanliga frågor och svar sammantagna för både standard Bio-Trap och avancerad Bio-Trap.

Vilken Bio-Trap kan användas vid karaktärisering av ett förorenat område om man vill:

- undersöka före, eller efter, utförd biostimulering och/eller bioaugmentation om det finns närvaro av mikroorganismer och gener som är kända för att kunna bryta ned t.ex. klorerade etener?

Svar: Standard Bio-Trap med analys av qPCR av både specifika mikroorganismer och gener.

- ta reda på responsen hos ett platsspecifikt mikrobiellt samhälle gentemot en potentiellt kommande aktiv biostimulering (injektion av förvald kolkälla eller kolkällor).

Svar: Avancerad Bio-Trap med MNA-del och BioStim-del + qPCR-analyser (funktionella gener, m.m.), analys av klorerade etener, samt möjligtvis även analys av isotoper (CSIA) av dessa.

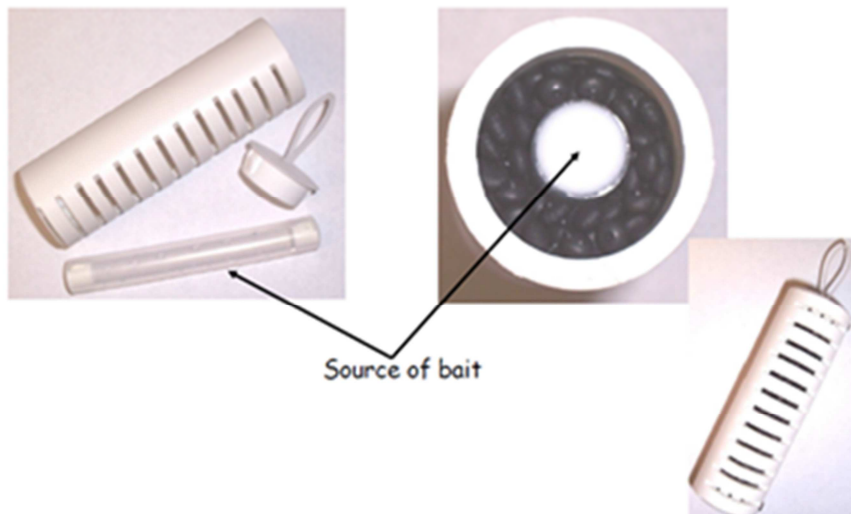
- utvärdera hur stor den platsspecifika potentialen för mikrobiell nedbrytning kan bli om man önskar tillföra mikroorganismer (bioaugmentation), speciellt utvalda för att bryta ned de klorerade etenerna?

Svar: Avancerad Bio-Trap med dels MNA-del och dels BioAug-del + qPCR-analyser, (funktionella gener, m.m.), analys av klorerade etener samt möjligtvis även analys av isotoper (CSIA).

- undersöka den platsspecifika potentialen om man tillsätter både kolkälla och mikroorganismer?

Svar: Avancerad Bio-Trap med MNA-del, BioStim-del och BioAug-del + qPCR-analyser (funktionella gener, m.m.), analys av klorerade etener samt möjligtvis även analys av isotoper (CSIA).

Tilläggas bör att i alla ovan givna fall kan även PLFA analyseras. Bio-Trap som består av någon del som kan laddas med något, t.ex. BioStim- eller BioAug-enheterna, kallas internationellt för "baited Bio-Trap". I Figur 3.4 visas en variant på baited Bio-Trap.



Figur 3.4 Design av en typ av Bio-Trap kallad "Tube-in-tube baited Bio-Trap" (Sublette et al., 2010).

4 Områdesbeskrivning

Detta kapitel baseras på information från föroreningsundersökningar genomförda av WSP Environmental AB i det aktuella området under åren 2008 till 2012. Följande undersökningar/rapporter har använts i beskrivningen:

- WSP, 2008a. PM Översiktlig miljöteknisk undersökning, Rampen 36, Falkenberg Fagerhults belysning AB, 2008-05-14.
- WSP, 2010a. PM Miljöteknisk undersökning, Rampen 36 i Falkenberg – klorerade alifater Fagerhults belysning AB, 2010-06-30.
- WSP, 2010b. Rapport Miljöteknisk undersökning, Rampen 36 i Falkenberg – klorerade alifater. Fagerhults belysning AB, 2010-06-30.
- WSP, 2010c. Fagerhults Belysning AB. Anmälan om avhjälpandeåtgärd på fastigheten Rampen 36, enligt 28§ i förordningen (1998:899) om miljöfarlig verksamhet och hälsoskydd. 2010-07-20.
- WSP, 2011. Rampen 36 – Kontrollprogram för klorerade lösningsmedel. Sammanfattning – provtagningar t.o.m. oktober 2011.
- WSP, 2012. Rampen 36 – Kontrollprogram för klorerade lösningsmedel. Sammanfattning – provtagningar t.o.m. oktober 2012. Ver. 2012-11-12.

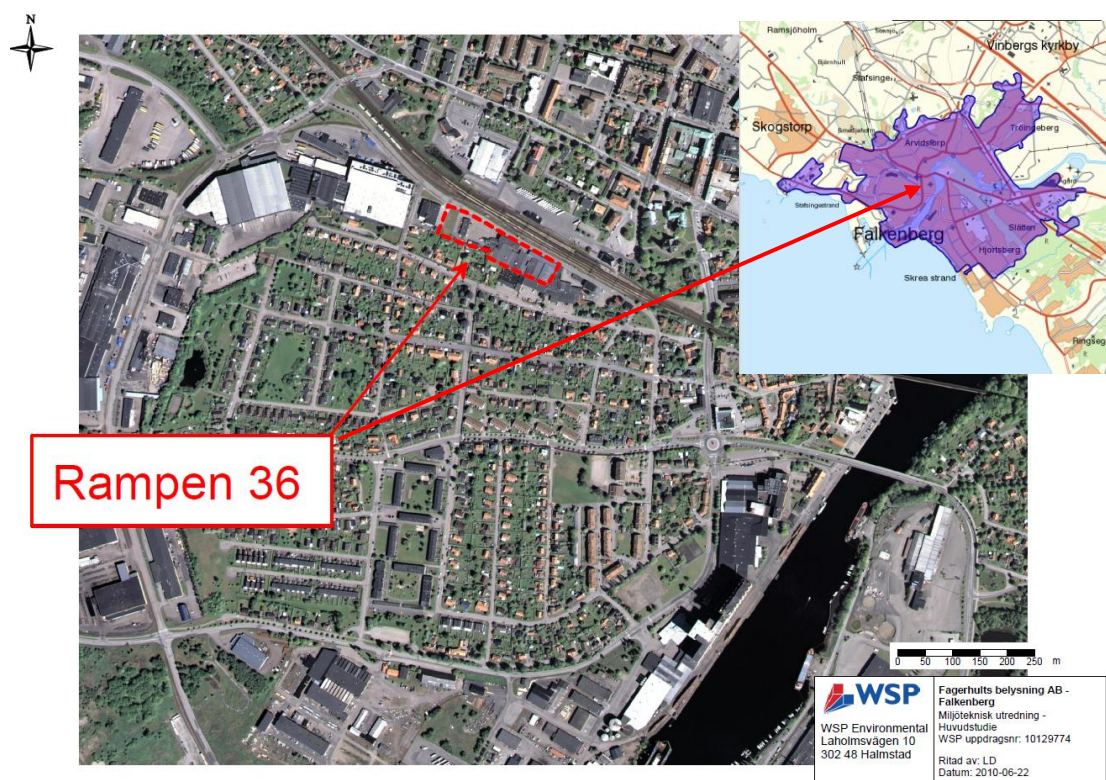
Utöver dessa undersökningar/rapporter har även följande studerats:

- WSP, 2008b. PM-Arbetstillmätningar – Inomhusluft, Fagerhults Belysning AB, 2008-10-23.
- WSP, 2010d. Miljöteknisk undersökning inom fastigheten Rampen 36 i Falkenberg – ytliga jordlager (PM och Rapport), 2010-05-31.

Det undersökta området är beläget i Hallands län, SV Sverige, ca 400-500 m SV om centrum i Falkenberg. I Figur 4.1 visas Falkenbergs tätort med lila färg och den aktuella fastigheten markeras med röd färg. Undersökningsområdet utgörs huvudsakligen av fastigheten Rampen 36 (45-50 meter bred och 220 meter lång) samt området strax nedströms fastigheten (ca 100 meter bred och 100 meter lång). Undersökningsområdets totala area uppgår till ca 22 000 m².

Fastigheten Rampen 36 inhyste Fagerhults Belysnings AB (kallat Fagerhult framöver i rapporten) som bedrivit verksamhet på platsen sedan 1930-talet. Fram till och med mars 2010 var Fagerhult fastighetsägare och Fagerhult ansvarar för den pågående efterbehandlingen. Byggnaderna på fastigheten utgörs av industrilokaler bestående av en enplans fabriksbyggnad, en kontorsbyggnad med källare, diverse förråd samt lager. Öppna ytor är asfalterade. I verksamheten har kemikalier med klorerade ämnen, tungmetaller, alifatiska, aromatiska och polyaromatiska kolväten hanterats (MIFO, 2002). De klorerade ämnen som använts har sannolikt varit trikloreten.

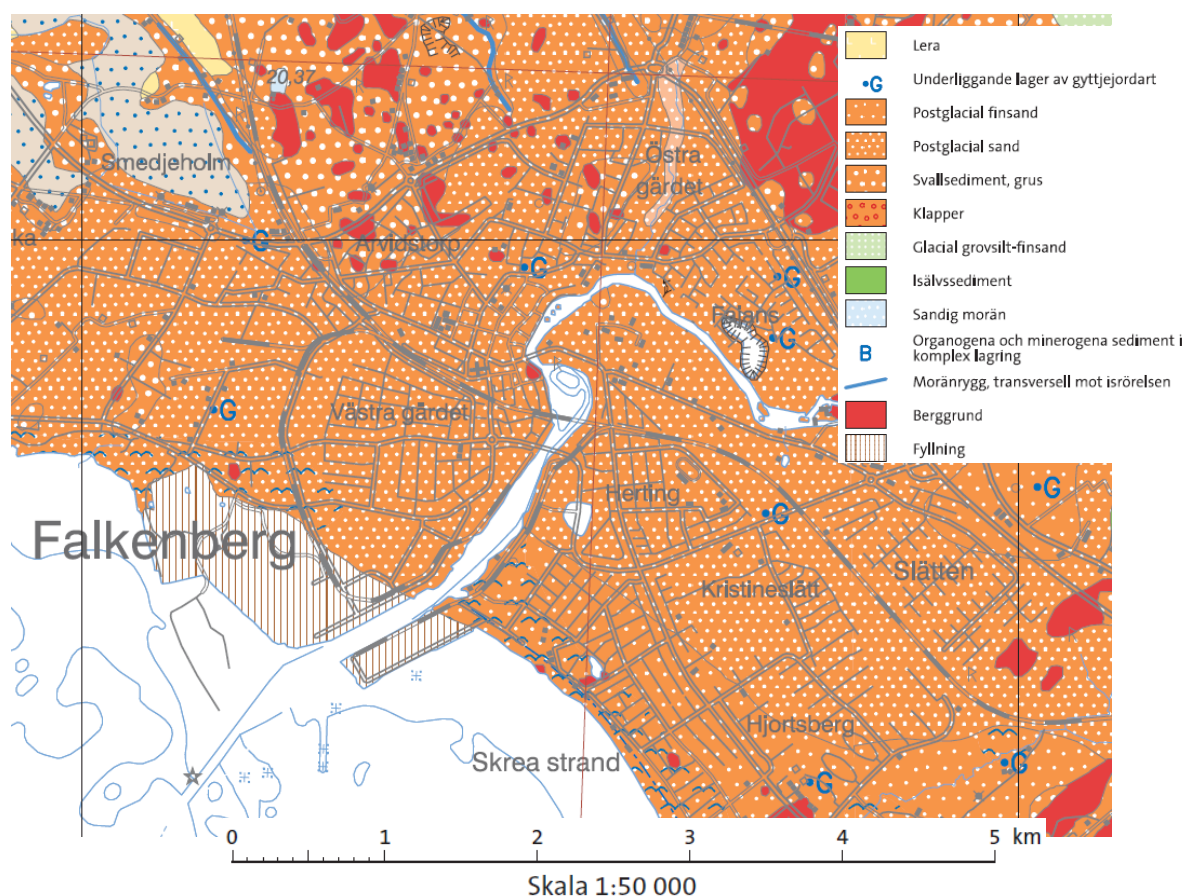
Fastigheten omges huvudsakligen av industrimark eller järnväg. I grundvattnets strömningsriktning mot söder, och därmed i spridningsriktning för föroreningar från fastigheten, finns dock ett bostadsområde som är berört av utredningarna. Samtliga fastigheter inom undersökningsområdet har kommunalt vatten. Avståndet till närmaste recipient, Ätran, är ca 600 m fågelvägen och avståndet till havet är ca 1,5 km.



Figur 4.1 Översiktskarta som visar placering av fastigheten Rampen 36 centralt i Falkenberg, Hallands län (mod. från WSP, 2010b).

4.1 Geologi

Jordartskartan över Falkenberg med omnejd (5B Varberg SO/5C Ullared SV) visar en östlig del bestående av morän och isälvsavlagringar samt en västlig del med glacial grovmo och sand, respektive grovmo, sand och grus. I övergångszonen finns större områden med lera och ytligt urberg. Tätorten Falkenberg är belägen i kartområdets västliga del, Figur 4.2, och ligger i princip helt på sand. Området där det undersökta området befinner sig uppges bestå av ca 3 m friktionsjord (sand) underlagrat av 4 m kohesionsjord. Även leryttja och torv under postglaciala minerogena sediment (äldre svämsediment) förekommer dock inom tätortens geologi och kan därför påträffas inom det undersökta området. Nordväst om Falkenberg sträcker sig ryggartade strukturer, s.k. Hallands kustmoräner, in mot centrum (NV–SV riktning). Kustmoränerna är ibland exponerade i ytan och beskrivs som svallgrus. Omedelbart norr och nordöst om tätorten finns synligt berg. Ån Ätran passerar genom Falkenberg. Dricksvatten i Falkenberg kommer från grundvatten men förstärks i några av vattenverken med vatten från både Ätran och Vinån.



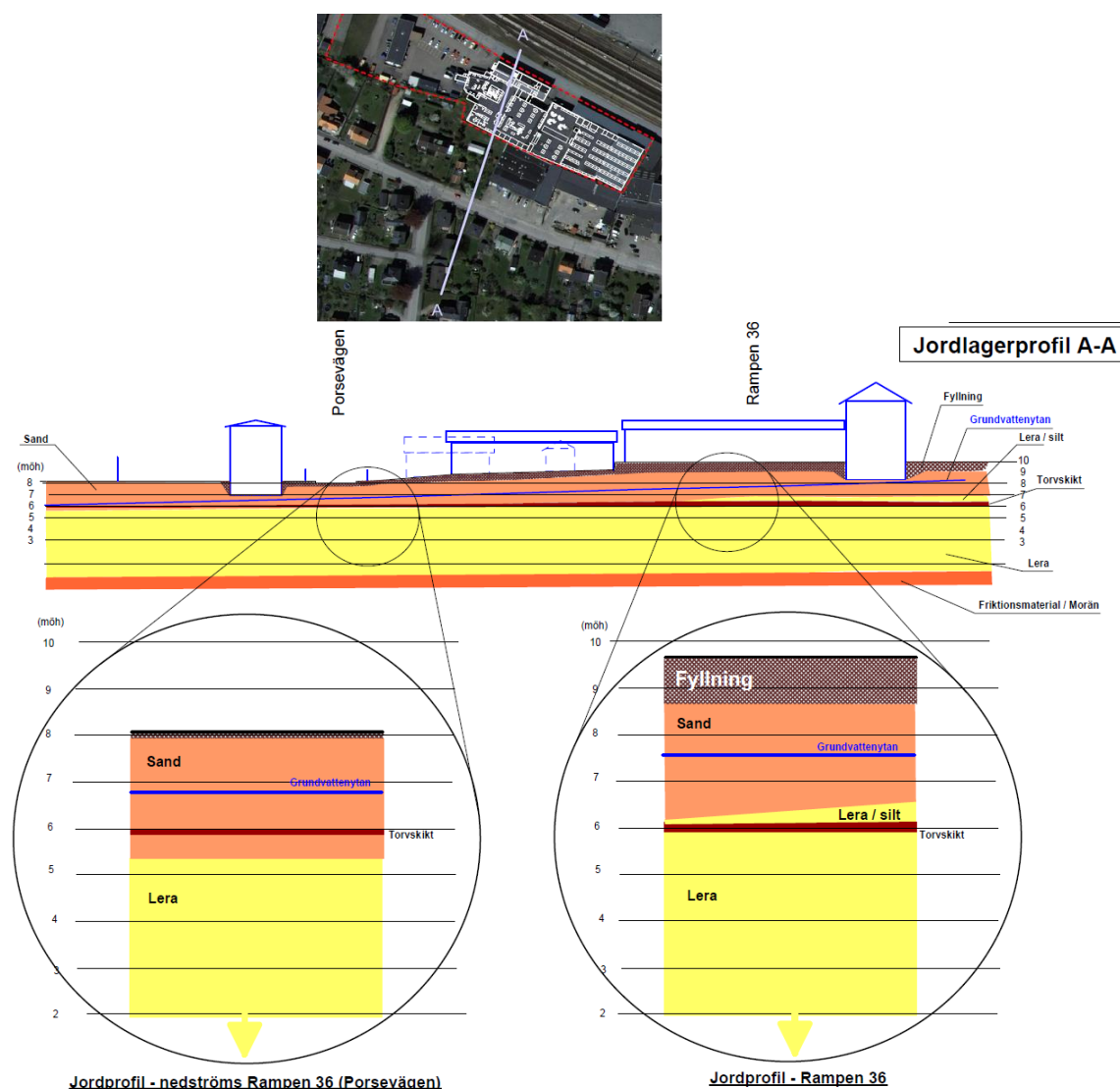
Figur 4.2 SGU:s jordartskarta (W9DY1XFqhY.pdf), ursprunglig storlek 1:50 000, förminskad till 62 %.

4.1.1 Geologi och hydrogeologi inom undersökningsområdet

Markytan inom Rampen 36 lutar svagt söderut i riktning mot bostadsområden. De många borrhningarna visar en geologi bestående ca 0,8 m fyllning (0–1,6 m.u.my.¹), underlagrat av mellansand-finsand som blir succesivt finkornigare till och med ca 3,5 m.u.my. I norra delen av fastigheten påträffas även silt/lera i den djupare belägna sanden. Under sanden finns ett 2-3 dm tjockt torvskikt och därunder lera. Leran har inlagrade skikt av sand och framför allt silt. Ca 30 m öster om området påträffas berg samt lerlager med en mäktighet begränsad till 1-2 m. Vid en centralt liggande provpunkt konstateras lera åtminstone ned till 11 m.u.my. I de västra delarna antas lerlagret kunna uppnå flera tiotals meter. I Figur 4.3 visas två representativa jordprofiler; varav en från det undersökta källområdet och en ifrån området nedströms källområdet (spridningsplymen).

Grundvattenytan ligger ca 1,5–1,8 m.u.my. Hydraulisk konduktivitet har uppskattats via slugtester till ca $3,2 \cdot 10^{-6}$ m/s i lerlagren under torvskiktet (där de mest tydliga föroreningsindikationerna erhållits). Hydraulisk konduktivitet i sandlager ovan torven är ca $7,4 \cdot 10^{-6}$ m/s, vilket kan betyda att sanden innehåller finkornigare skikt. Den hydrauliska gradienten i lerlagren är ca 1 %, vilket medför en flödes hastighet på ca 1,1 m/år (gradient varierande mellan 0,8 och 1,4). Grundvattnet rör sig söderut mot bostadsområdet.

¹ m.u.my. = meter under markyta



Figur 4.3 Jordlagerföljder inom och nedströms fastigheten Rampen 36 (WSP, 2010a).

4.2 Föroreningsituation

Inom fastigheten påträffas klorerade etener (TCE, *cis*-DCE och VC) i grundvattnet på mellan 3 och 6 m djup. Denna förorening har en utbredning som uppskattats till ca 30•35 m. Föroreningshalter i grundvattnet uppgår till som mest ca 3 200 µg TCE/l, 1 500 µg *cis*-DCE/l och 210 µg VC/l. Samma typ av föroreningar påträffas i grundvattnet nedströms fastigheten i ett område som sträcker sig ca 50 m söder om Rampen 36. Föroreningen uppträder här från ca 2 till 5 m.u.my. Högst uppmätta halter i spridningsområdet är 160 µg TCE/l, 880 µg *cis*-DCE/l och 18 µg VC/l.

I jord har höga koncentrationer av TCE och *cis*-DCE främst påträffats i ett torvskikt beläget ca 3,5 till 3,8 m.u.my. inom fastigheten, men även sanden innehåller förorening. Som mest har halter på 100 mg TCE/kg TS och 60 mg *cis*-DCE/kg TS uppmätts. Den djupast provtagna jorden, 3,5–3,7 m.u.my., innehåller 35 mg TCE/mg TS och 0,56 *cis*-DCE/kg TS. Förorening i jord har därutöver påträffats i spridningsområdet längs med Porsevägen, söder om fastigheten. Vinylklorid har inte hittats i jord.

Jordförorening har även undersökts med hjälp av 27 MIP-sonderingar inom fastigheten samt 10 sonderingar längs med Porsevägen. MIP-sonderingarna har möjliggjort en förbättrad bedömning av föroreningens utbredning.

Porluft har analyserats på kolrör och genom fältmätningar med PID. Både TCE och *cis*-DCE har påträffats i tämligen höga halter. Medelhalten TCE, i de punkter där TCE påträffats, har beräknats till 14 780 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, varav högst uppmätt halt är 100 000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (år 2010).

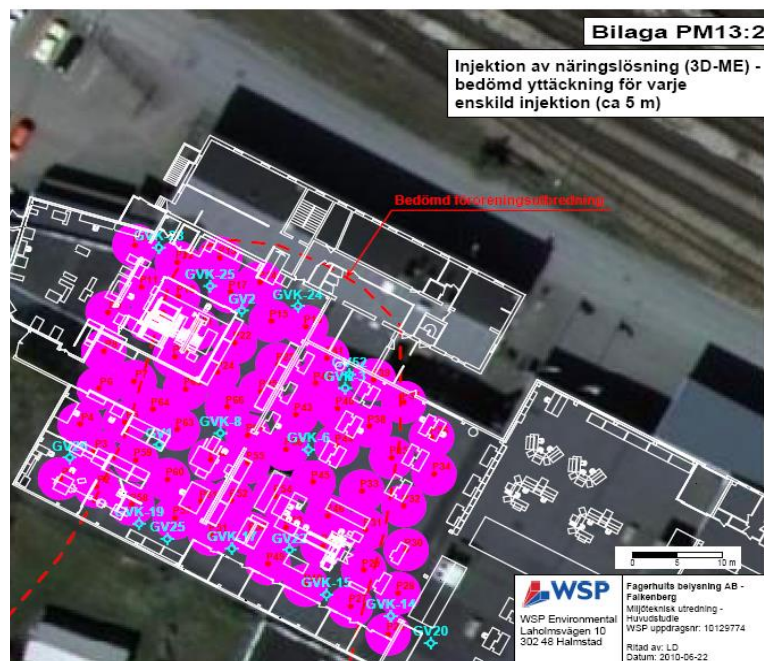
Platsspecifika riktvärden för grundvatten har beräknats för två situationer, dels ”Platta på mark” – vid Rampen 36, och dels ”Källare” – vid Rampen 36. Riktvärdena visas i Tabell 4.1.

Tabell 4.1 Platsspecifika riktvärden för grundvatten ($\mu\text{g}/\text{l}$).

Plats \ Ämne	PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	VC
”Platta på mark” – vid Rampen 36	100	80	300	25
”Källare” – vid Rampen 36	50	50	200	15

4.3 Effekt av förstärkt självrening

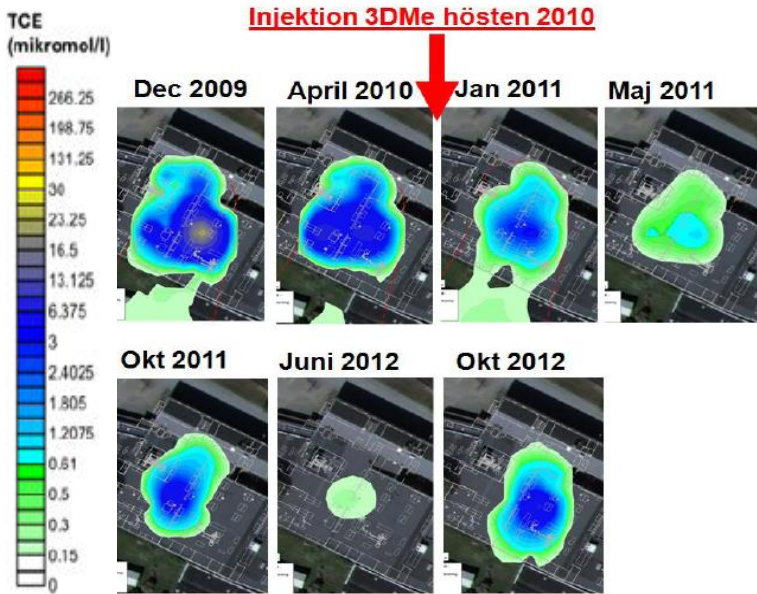
Efter formell anmälan till tillsynsmyndigheten (insänt juli, 2010) igångsattes under hösten 2010 en saneringsinsats inom Rampen 36. Den valda saneringsmetoden var förstärkt självrening och baserade sig på injektioner av kolkälla med syfte att stimulera pågående mikrobiell nedbrytning i källområdet (injektion med 3DMe från Regenesys Inc.). Injektionstester med vatten för att bedöma lämpligt tryck och injektionsfrekvens utfördes av Ejlskov i mars, 2010 (rapporteras i WSP, 2010b). Genomförda injektioner med 3DMe samt förväntade influensradier visas i Figur 4.4.



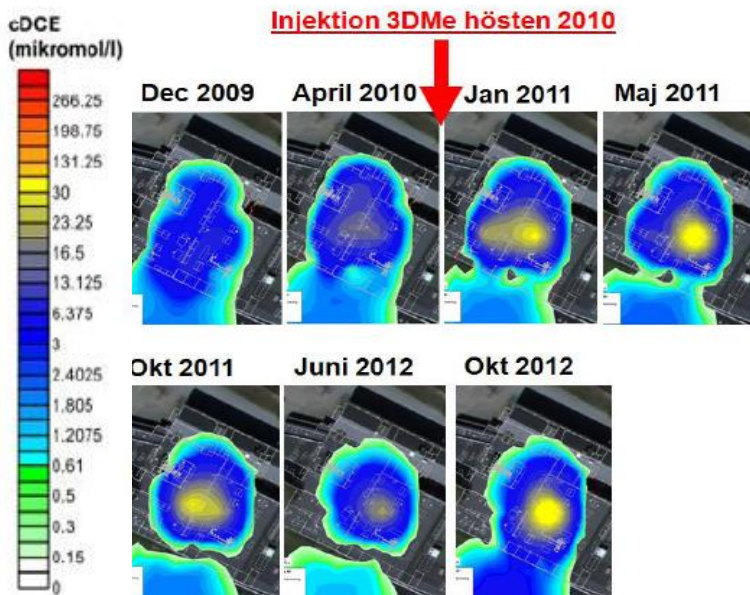
Figur 4.4 Lila fält visar var injektion av kolkälla skett hösten 2010 samt förväntad influensradie för respektive injektionspunkt (WSP, 2010c).

Resultatet av biostimuleringen har till och med 2012 följts upp med minst fyra kontrollprovtagningar i 14 grundvattenrör inom fastigheten, fem grundvattenrör längs med Porsevägen samt fem privata brunnar på närliggande fastigheter. Ytterligare 11 grundvattenrör har provtagits men visat koncentrationer som underskrider de platsspecifika riktvärdena. Ytterligare provtagning har gjorts i ett urval av grundvattenrören.

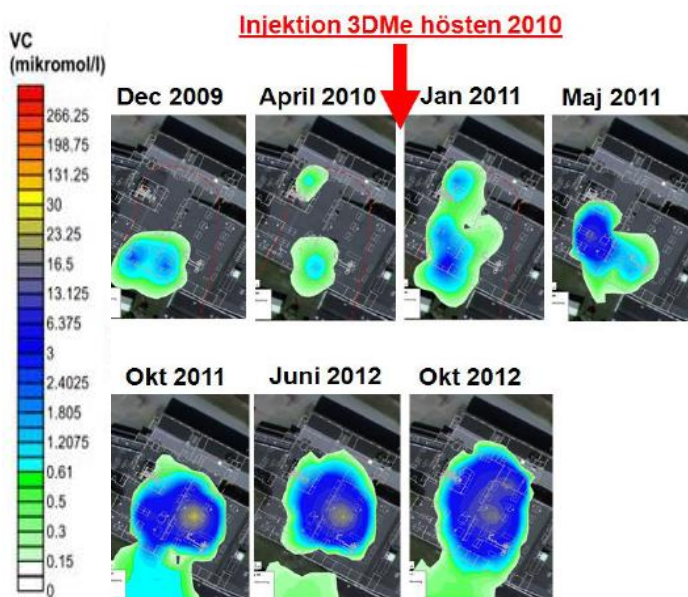
I Figur 4.5 till 4.7 visas en grafisk sammanfattning av utvecklingen av källområdets grundvatteninnehåll av TCE, *cis*-DCE och VC.



Figur 4.5 Utbredning över tid av TCE i grundvattnet (WSP, 2012).



Figur 4.6 Utbredning över tid av *cis*-DCE i grundvattnet (WSP, 2012).



Figur 4.7 Utbredning över tid av VC i grundvattnet (WSP, 2012).

Analys av de klorerade etenerna visade att nedbrytning av de hög- och medelklorerade etenerna i medeltal ökade efter injektionen/biostimuleringen men att en uppkoncentrering av VC skedde under samma tid. Nedbrytningen var av typen reduktiv deklorering. Vid provtagning av grundvattnet i okt 2011 förelåg i tretton provpunkter minst en av de klorerade etenerna med halt över fastställda åtgärdskrav för enskild kloreten, varav i åtta punkter med halt av VC signifikant över, eller mycket över (max 1700 µg/l), dess åtgärdskrav. Före biostimuleringen var halten VC signifikant över (max 210 µg/l) nämnda krav i tre punkter och utbredningen av VC kan sägas ha ökat (eg. nedbrytning till VC har skett i fler punkter).

Före biostimuleringen beräknades den totala teoretiska dekloreringsgraden, DKG, sedan utsläppet (baserat på antagandet att utsläppet endast bestod av TCE) vara ca 20–30 % (för förklaring av DKG, se Avsnitt 3.1). Vid provtagning i oktober 2011 beräknades DKG ligga i intervallet 40–70 %. Effekt av tillsatsen av kolkälla/biostimuleringen synes alltså ha varit betydlig. Emellertid erhöles samtidigt en markant uppkoncentrering av VC samt i viss mån även av *cis*-DCE i vissa punkter. Nedbrytningen av VC var alltså mindre än produktionen av densamma. Isotopanalyser indikerade att, förutom TCE, även en mindre del av VC och *cis*-DCE brutits ned mikrobiellt efter biostimuleringen.

De kontrollprovtagningar som utfördes efter biostimuleringen fram till föreliggande studie visade sammantaget att reduktiv deklorering av främst TCE men även *cis*-DCE skett samt att motsvarande mikrobiella förhållanden varit någorlunda goda. Emellertid, motsvarande nedbrytning av VC var avsevärt lägre än produktionen av densamma samt att de mikrobiella förutsättningarna inte varit optimala för sådan nedbrytning. En mer ingående beskrivning av bl.a. mikrobiell status ges i följande kapitel.

5 Förutsättningar inför SGI-projektet

5.1 Inledning

Som framgår av Kapitel 4 föreligger god kunskap om området Rampen 36. Föreliggande kapitel sammanfattar översiktligt resultaten av främst tidiga/inledande undersökningar samt den konceptuella föroreningsmodell som sammantaget beskriver området före igångsättningen av den biostimulering som utfördes i oktober 2010. Denna biostimulering omfattade injektion av kolkälla (3DMe, Regenesys Inc.). Avsikten var att stimulera den mikrobiella aktiviteten i jorden och grundvattnet så att den reduktiva nedbrytningen av klorerade lösningsmedel signifikant ökade.

I detta kapitel ges alltså information framtagen av WSP före det nu aktuella samarbetsprojektet. Denna information, som delvis avspeglar situationsförändringarna direkt efter biostimuleringen, kan speciellt kopplas till de undersökningar som sedermera utfördes under 2012 i det aktuella samarbetet mellan WSP och SGI.

5.2 Undersökningar av föroreningar, isotoper och mikrobiologi

Det förorenade området har undersökts av WSP före föreliggande projekt med avseende på ett stort antal parametrar och föroreningar under flertal tillfällen. Resultaten från undersökningarna före oktober 2010 låg till grund för beslut att genomföra biostimulering. Efter biostimuleringen i slutet av 2010 har WSP, som ett led i saneringens kontrollprogram, främst fokuserat på utbredning och haltförändring av förorening, mikrobiella förhållanden samt isotoper. Resultaten har redovisats i flertal WSP rapporter (WSP 2010a; WSP 2010b; WSP 2012) och legat till grund för bedömning av den under 2010 genomförda biostimuleringen samt eventuellt behov av bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering.

I förhållande till SGI:s föreliggande projekt utgör ovan beskrivna analyser och aktiviteter ett viktigt underlag för att värdera olika parametrars tidsmässiga utveckling fram till och med idag, och därmed utgör de också underlag för att bedöma den fortsatta utvecklingen samt slutresultatet av saneringen. Sammantaget har WSP tidigare utfört bl.a.:

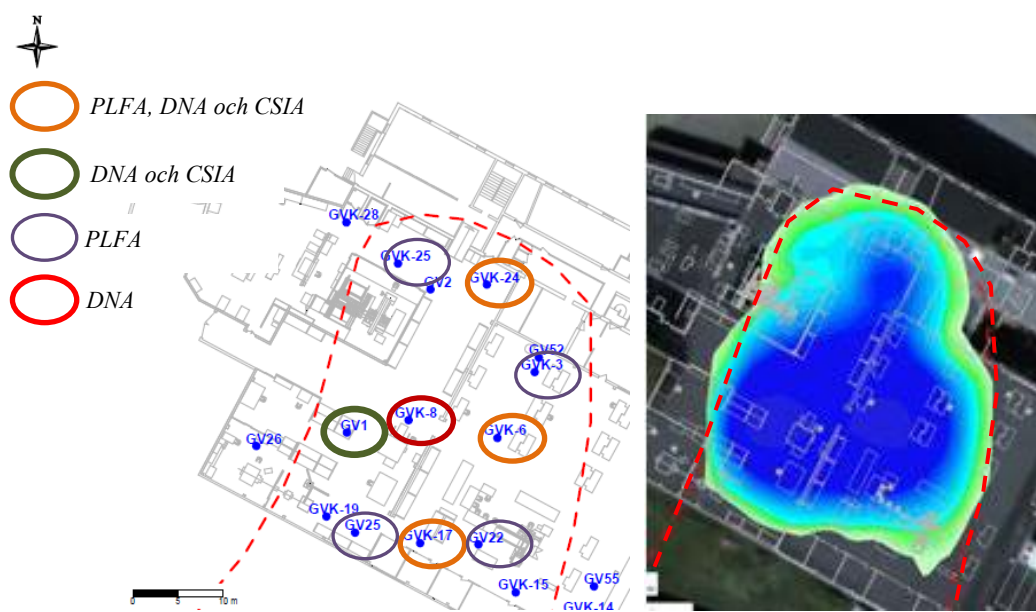
- analys av föroreningar och nedbrytningsprodukter i grundvatten
- DNA-undersökningar med passiva provtagare, standard Bio-Trap (qPCR)
- isotopanalyser (CSIA)
- mikrobiella analyser via PLFA

Föroreningssituationen har översiktligt beskrivits i tidigare kapitel. Nedan ges information om utfallet från mikrobiella analyser och isotopanalyser utförda av WSP före aktuellt samarbetsprojekt. Resultat kopplade till utfallet från de i föreliggande projekt genomförda undersökningarna redovisas och utvärderas i efterföljande kapitel.

Isotopanalyser utfördes vid två tillfällen; december 2009 och januari 2011, dvs. före respektive efter att biostimuleringen utfördes i oktober 2010. Vatten till CSIA analyserna provtogs från: GV1, GVK6, GVK17 och GVK24². Placeringen av bl.a. dessa grundvattenrör visas i Figur 5.1 samt i Avsnitt 6.2.

² Grundvattenrör = Ø63 mm, GVK-rör = Ø25 mm)

De mikrobiella analyserna av PLFA och DNA utfördes, liksom isotopanalyserna, före respektive efter biostimuleringen i oktober 2010. De mikrobiella provtagningarna gjordes i januari 2010 och februari/mars 2011. PLFA utfördes på grundvatten från GVK3, GVK6, GVK17, GVK24, GVK25, GV22 och GV25. DNA-analyser utfördes på prov från grundvattenrör GV1, GVK6, GVK8, GVK17 och GVK24. I Figur 5.1 visas samtliga grundvattenrör som undersöktes vid dessa tillfällen m.a.p. isotoper och mikrobiellt innehåll är placerade i källområdet. De utförda analyserna beskrivs mer ingående i följande avsnitt.



Figur 5.1 Provtagningspunkter för isotoper och mikrobiella analyser (2010 och 2011). Till höger i bild visas bedömd utbredning av TCE i grundvatten från samma område i april 2010, dvs. före biostimuleringen (modifierat från WSP, 2012).

5.2.1 Isotopanalyser, CSIA

Mikroorganismer föredrar att bryta ned en molekyl del som innehåller isotopen ^{12}C , jämfört med isotopen ^{13}C . Förskjutningen mot ^{13}C i kvarvarande förening är därför en indikation på att minskningen av föreningens halt beror på nedbrytning och inte på andra orsaker (se Avsnitt 3.3).

Analys av fördelningen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i de klorerade etenerna visade efter biostimuleringen en tydlig ökning av ^{13}C och därmed en ökad $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ kvot (mindre negativ), vilket indikerar att det efter biostimuleringen skett ökad mikrobiell nedbrytning/deklorering. Som framgår av Tabell 5.1 noteras en stigande ackumulering av ^{13}C isotoper i samtliga grundvattenrör från december 2009 till januari 2011, dvs. före respektive efter stimuleringen i oktober 2010 av den mikrobiella dekloreringsaktiviteten. Det stigande innehållet av ^{13}C noterades inte bara för TCE utan även för nedbrytningsprodukterna *cis*-DCE och VC.

Tabell 5.1 $\delta^{13}\text{C}$ i grundvatten provtaget dels i december 2009 (före biostimuleringen), dels i januari 2011 (efter biostimuleringen) (WSP, 2012).

Förorening	GV 1	GVK 6	GVK 17	GVK 24
TCE – före injektering	-5,93	-13,77	-11,86	-14,77
TCE – efter injektering	.. ¹⁾	-0,11	-6,46	-4,68
cDCE – före injektering	-31,24	-27,81	-18,11	-21,11
cDCE – efter injektering	-17,25	-22,63	-7,12	-24,60
VC – före injektering	-42,88	.. ¹⁾	-40,39	.. ¹⁾
VC – efter injektering	-22,01	-30,88	-22,38	.. ¹⁾

¹⁾ Förorening ej detekterbar vid analys

Man bör vara uppmärksam på att ^{13}C -innehållet i TCE inte motsvarar förhållandet då spillet av föroreningen inträffade utan istället den aktuella situationen vid provtagningstillfället, efter flera års naturlig nedbrytning, spädning, sorption, m.m. Haltskillnader mellan de olika grundvattenrören, före injektionerna, kan därför tolkas som variationer i den naturliga nedbrytningen i området, alternativt styras av spridning och fastläggning.

Microseps Inc., USA, som analyserade isotoperna, utförde samtidigt haltanalyser av de olika klorerade etenerna (för kvantifiering av isotopförhållanden). Efter injektionerna har innehållet av TCE i GV1 underskridit deras analysmetods detektionsgräns, vilket tolkats som att föroreningen helt omvandlats till sina dotterprodukter. Observera att analys av vattenprover även utförts vid ett flertal tillfällen av ALS Scandinavia AB. De resultaten redovisas i Kapitel 7.

I GVK6 kunde VC inte påvisas före biostimuleringen (och därmed ej heller dess isotoper), men väl efter stimuleringen. Detta är i sig en dokumentation på att nedbrytning skett från *cis*-DCE till VC. I samma borrhål noterades samtidigt en markant nedbrytning av TCE.

I GVK24 detekterades $\delta^{13}\text{C}$ för *cis*-DCE med något större negativt värde efter stimuleringen, eventuellt på grund av avsaknad av mikrobiell nedbrytning.

Det noterades att det inom det undersökta området inte kunde identifieras något mönster i isotoputveckling, i förhållande till borrhålens placering jämfört med källa och plym; uppströms källan, vidare till borrhål GV1 och GVK6 centralt i källan, till GVK17 nedströms i källområdet.

5.2.2 PLFA

Analys av PLFA är en metod som kan användas för att bestämma övergripande mikrobiell struktur samt för att se förändringar i struktur före respektive efter biostimulering. Analysen görs genom att analysera innehållet av fettsyror (phospholipid fatty acids) i mikroorganismernas cellmembran ("skinn"). Membranet består till stora delar av fettsyror och en analys ger information om den mikrobiella strukturen. PLFA bryts snabbt ned då organismerna dör och en analys av PLFA motsvarar därför aktiva/levande mikroorganismer.

De utförda PLFA-analyserna visade att det skett en måttlig tillväxt av Firmicutes (ett samlingsnamn för en större stam av bakterier med cellmembran). I huvuddelen av denna grupp ingår de organismer som utför fermentering av kolkälla med bildandet av det väte som behövs för dekloreringen. Vissa undergrupper i denna grupp anses också ha potential att utföra reduktiv deklorering, medan andra t.ex. omvandlar

sulfat till sulfid. I gruppen ingår bl.a. kloreten-respirerande bakterier som både kan fermentera kolkälla och generera väte samt dessutom kan utföra reduktiv deklorering.

Som visas i Tabell 5.2 skedde en tydlig tillväxt av mikroorganismer i hela det undersökta området efter att kolkälla injicerades i oktober 2010. Tillväxten (angiven som identifierade antal celler) gick från en bedömd låg-moderat nivå (10^4 – 10^5 celler) till en entydigt moderat nivå. Tillväxtfaktor, dvs. tillväxt av antal celler, i förhållande till före biostimuleringen, låg mellan 4 och över 30. Den relativt sett lägsta tillväxten skedde i flertal fall i områden där det innan biostimuleringen noterades ett förhållandevis moderat antal mikroorganismer. Störst relativ tillväxt skedde i provpunkten som innan biostimuleringen påvisade lägst innehåll av mikroorganismer.

Studerar man den mikrobiella populationen och dess förändringar, Tabell 5.3, iakttas bl.a. en tillväxt av bakteriegruppen Firmicutes (analyseras som TerBrSats – laboratoriets benämning) som bl.a. lever i syrefria miljöer och som producerar väte som är nödvändigt för att reduktiv deklorering ska ske.

Det har dessutom skett en tillväxt av järn- och sulfatreducerande bakterier (BrMonos och MidBrSats, laboratoriets benämning), vilket tyder på att redox-förutsättningarna för reduktiv deklorering har ökat sedan biostimuleringen utfördes.

Både före och efter biostimuleringen utgjordes den största bakteriegruppen av Monoenoic (Monos), vilka omfattar både aeroba och anaeroba bakterier. Den procentuella andelen Monoenoic sjönk dock från ca 81 % till 71 %, vilket antas berott på minskad andel aeroba bakterier i denna grupp, till fördel för tillväxt av anaeroba bakterier inom andra grupper. Förändringen var sannolikt ett resultat av de förändrade geokemiska förhållandena och ändrade livsbetingelser.

Slutligen tyder erhållen tillväxt av gruppen General (Nsats – laboratoriets benämning) på en förändring mot en mindre diversifierad bakteriesammansättning.

Tabell 5.2 Total biomassa bestämd genom PLFA, 9 månader före, och 5 månader efter, biostimuleringen (injektion av kolkälla) i oktober 2010 (WSP, 2012).

Total biomassa (celler / enhet)	Jan 2010 (före biostimulering)	Mars 2011 (efter biostimulering)	Tillväxt, faktor (relativt jan 2010) ^{a)}
GVK3	$2,18 \times 10^5$	$4,26 \times 10^6$	Ca 20
GVK6	$5,55 \times 10^5$	$2,32 \times 10^6$	Ca 4
GVK17	$2,93 \times 10^5$	$2,45 \times 10^6$	Ca 8
GVK24	$1,53 \times 10^5$	$1,09 \times 10^6$	Ca 7
GVK25	$4,50 \times 10^5$	$1,66 \times 10^6$	Ca 4
GV22	$8,17 \times 10^4$	$2,76 \times 10^6$	Ca 34
GV25	$1,23 \times 10^5$	$3,23 \times 10^6$	Ca 26

^{a)} Ca: Cirka

Tabell 5.3 Fördelning av mikrobiell struktur i sju grundvattenrör samt förändringar nio månader före, respektive fem månader efter, biostimulering genom injektion av kolkälla oktober 2010 (WSP, 2012).

Mikrobiell sammansättning	Jan 2010 (före biostimulering). Innehåll (%)*. Genomsnitt (max/min) i %.	Mars 2011 (efter biostimulering). Innehåll (%)*. Genomsnitt (max/min) i %.
Firmicutes (TerBrSats)	0,55; 2,27; 1,37; 1,40; 3,72; 0; 0,51 (0 / 3,7)	3,04; 11,24; 5,13; 4,48; 5,08; 3,55; 3,57 (3,0 / 11,2)
Proteobacteria (Monos)	82,63; 87,26; 82,89; 79,55; 77,72; 75,62; 77,21 (77,2 / 87,3)	77,46; 66,27; 72,46; 70,11; 72,55; 65,95; 65,27 (66,3 / 77,5)
Anaeroba metall-reducerare (BrMonos)	0; 0,22; 0; 0; 0,20; 0; 0 (0 / 0,2)	0,31; 0,39; 0,51; 1,93; 0,32; 0,19; 0,26 (0,2 / 1,9)
SRB/Actinomycetes (MidBrSats)	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0 (0 / 0)	0,36; 1,07; 4,48; 3,05; 4,48; 1,11; 1,46 (0,4 / 4,5)
General (Nsats)	14,98; 8,82; 14,31; 18,10; 17,16; 21,98; 22,29 (8,8 / 22,3)	17,22; 20,75; 17,03; 18,99; 16,84; 28,69; 29,26 (16,8 / 29,3)
Eukaryotes (polyenoics)	1,83; 1,44; 1,41; 0,95; 1,20; 2,39; 0 (0 / 2,4)	1,60; 0,28; 0,40; 1,43; 0,74; 0,49; 0,18 (0,2 / 1,6)

Anm. * = i nämnda ordning GVK3, GVK6, GVK17, GVK24, GVK25, GV22 och GV25.

5.2.1 qPCR

En annan metod som används för att karakterisera den mikrobiella strukturen och förändringar i denna är att bestämma specifika genskvenser i DNA-strukturen (alternativt den mer ömtåliga RNA-strukturen) med qPCR. I föreliggande fall har alla analyser fokuserats på DNA.

Provtagningsmedium kan vara grundvatten, jord eller sorbenter i olika Bio-Trap. I föreliggande fall var mediet sorbent i standard Bio-Trap. Sådan placeras i grundvattenrör och anpassar sig passivt till det mikrobiella samhälle som råder i den omgivande grundvattenformationen. Metoden kan t.ex. ge information om den mikrobiella genetiska nedbrytningspotentialen i ett prov.

De DNA-analyser som utfördes gav bl.a. att injektionen av kolkälla generellt ökade antal järn- och sulfat-reducerande bakterier. Deras ökning indikerade bl.a. att de geokemiska förhållandena (t.ex. redox) för reaktiv deklorering förbättrades efter injektionen. Analyserna visade även att antalet *Dehalobacter* ökat. *Dehalobacter* är bakterier som kan deklorera PCE och TCE, men sällan DCE och generellt inte VC. Därtill har *Dehalococcoides* ökat något i antal, dock endast i ett av de fem provtagna grundvattenrören. *Dehalococcoides* omfattar mikrobiella undergrupper som kan deklorera DCE till VC och/eller VC till eten (Avsnitt 3.4).

I Tabell 5.4 visas hur mängden celler förändrades från före stimuleringen till efter stimuleringen. Den totala mängden mikroorganismer ökade mer än 300 gånger, i förhållande till utgångsvärdet före biostimuleringen. Utgångsvärdet var i storleksordningen 10^6 gener/enhet och värdet efter stimuleringen var i storleksordningen 10^8 gener/enhet. En väsentlig stigning noterades för järn- och sulfatreducerande bakterier, vilket visade att den geokemiska miljön utvecklades i riktning mot de mer reducerande förhållanden som är fördelaktiga för reaktiv deklorering.

Som ses i tabellen steg innehållet (antal celler/enhet) av *Dehalobacter* i medeltal ca 3 000 gånger under hela perioden. Innehållet ökade från en låg nivå (i storleksordningen 10^2) före biostimuleringen till en moderat nivå (i storleksordningen 10^6) några månader efter biostimuleringen. Potentialen för reaktiv deklorering av TCE (och eventuellt i någon mån *cis*-DCE) ökade alltså markant efter stimuleringen.

Innan biostimuleringen påvisades *Dehalococcoides* endast i ett (GVK17) av fem undersökta grundvattentrör. Något anmärkningsvärt är det minskade innehållet i GVK17, från $1,1 \cdot 10^3$ celler/enhet innan stimuleringen till $7,5 \cdot 10^2$ celler/enhet efter stimuleringen. Antalet celler/enhet kan dock fortfarande anses ha varit i samma storleksordning. I övriga borrhål, GVK6, GVK8, GVK24 och GV1, hade *Dehalococcoides* inte påträffats innan stimuleringen men däremot efter. I samtliga borrhål var innehållet i storleksordningen $5 \cdot 10^2$ celler/enhet.

I Tabell 5.5 ges detekterade antal funktionella gener/enhet i fem standard Bio-Trap dels före, dels efter, biostimuleringen. Av tabellen framgår att rapporteringsnivån för generna *tceA* och *vcrA* var högre 2010 vilket gör bedömning av eventuell ökning av dessa från 2010 till 2011 någon osäker. Emellertid framgår tydligt att antal celler med genkoden för *bvcA* generellt ökade i nästan alla provpunkter. Detta visar att potentialen (DNA-analys) för deklorering av VC till eten ökade i de motsvarande undersökta grundvattentrörerna efter biostimuleringen. Nivåerna på värdena 2011 kan eventuellt betraktas som något låga för optimal deklorering, inte minst med tanke på att analyserna utfördes på DNA och inte på RNA (se Avsnitt 3.4).

Tabell 5.4 Ungefärliga förändringar av antal celler/enhet från januari 2010 till mars 2011, (före - efter stimulering). Angivna siffror motsvarar den faktor bakterierantalet ökat med. Underliggande data från WSP (2012).

Typ av Bakterie	GVK6	GVK8	GVK17	GVK24	GV1	Medel
Total antal bakterier	600	100	160	40	700	320
Methanogena bakt.	2700	1000	1000	370	500	1100
Järn- och sulfat-reduc. bakt.	600000	35000	14000	9500	5600	130000
Dehalobacter	4400	1500	11000	700	600	3600
Dehalococcoides (DHC)	*	*	0,7	*	*	-

Not. * I dessa prover kunde DHC inte påvisas före stimuleringen. Efter stimulering förelåg de i storleksordningen 5×10^2 celler/enhet (dvs. relativt låga värden).

Tabell 5.5 Analyserade funktionella gener (anges ibland med tillägget "reductase") i standard Bio-Trap provtagarna januari 2010–mars 2011 (före - efter stimulering). Halt: celler/bädd. Data från WSP (2012).

Funktionell gen \ Provpunkt	GVK6	GVK8	GVK17	GVK24	GV1
tceA	$<1,0 \cdot 10^3 - 1,4 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^3 - 1,3 \cdot 10^1$ A	$<1,0 \cdot 10^3 - 9,8 \cdot 10^1$	$<1,0 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^3 - 2,6 \cdot 10^2$
bvcA	$<1,1 \cdot 10^1 - 2,6 \cdot 10^1$	$<1,1 \cdot 10^1 - 1,7 \cdot 10^1$ A	$2,0 \cdot 10^3 - 8,8 \cdot 10^2$	$<1,1 \cdot 10^1 - 3,7 \cdot 10^1$	$<1,1 \cdot 10^1 - 3,7 \cdot 10^2$
vcrA	$<8,4 \cdot 10^1 - 1,6 \cdot 10^1$ A	$<8,4 \cdot 10^1 - <2,5 \cdot 10^1$	$<8,4 \cdot 10^1 - 5,2 \cdot 10^0$ A	$<8,4 \cdot 10^1 - 1,3 \cdot 10^1$ A	$<8,4 \cdot 10^1 - <2,5 \cdot 10^1$

A/ Uppskattat antal genkopior från datavärde mellan detektionsgräns och rapporteringsgräns.

6 Utförande i aktuellt projekt

6.1 Inledning

Med en förhållandevis enkel och homogen geologi, en väl undersökt föroreningsituation, samt det faktum att saneringsmetoden redan visat sig fungera i området, är Rampen 36 väl lämpat som testområde för att, i aktuellt samarbetsprojekt mellan WSP och SGI, bedöma om ytterligare biostimulering (utöver den som utfördes 2010) och/eller bioaugmentation har potential att påskynda nedbrytningen. Platsen är dessutom väl lämpad för att ta fram ny kunskap avseende innovativa metoder. Som komplement till tidigare och parallellt utförda arbeten av WSP har en omgång isotopanalyser och analyser av mikrobiell miljö utförts inom föreliggande projekt. Analysprogrammet har även utvidgats och nya tekniker har testats.

I projektet har följande undersökts:

- 1) Det mikrobiella samhället i akvifären med fokus på reduktiv dekloreringsförmåga.
- 2) Isotopsammansättning hos förorening för direkt bevis på nedbrytning.
- 3) Effekter på det mikrobiella samhället respektive på nedbrytning av klorerade etener beroende på om ytterligare kolkälla (biostimulering) och/eller mikroorganismer (bioaugmentation) tillförs.
- 4) Effekter av tidigare genomförd biostimulering.

Med hjälp av ovanstående har projektet haft som målsättning att, med fokus på det aktuella området, testa och bedöma möjligheterna för att:

- bestämma det aktuella nedbrytningsstadiet i källa och plym i ett pågående, aktivt saneringsförlopp
- dokumentera huruvida det sker en fullständig nedbrytning av TCE till eten
- bedöma behovet av ytterligare biostimulering av mikroorganismerna (förnyad injektionsomgång med kolkälla)
- bedöma behovet av att tillföra mikroorganismer (bioaugmentation)

och beskriva erfarenheter med:

- att använda avancerad Bio-Trap och dekloreringsgrad samt analys av isotoper, mikroorganismer, deras PLFA och specifika gensekvenser i DNA.

Provtagningsplanen utarbetades i samarbete mellan SGI och WSP och genomfördes av WSP under perioden maj–september 2012. Den passiva provtagningsutrustning som användes inom projektet var dels standard Bio-Trap och dels avancerad Bio-Trap, båda från Microbial Insights, Inc. USA. Avancerad Bio-Trap som testades laddades dessförinnan av Microbial Insights, Inc. med fyra olika kolkällor, fördelade enligt Tabell 6.1. 3DMe och HRC är kommersiella produkter från Regenesys Inc., USA. Alla BioAug-enheter i de avancerad Bio-Trap-enheter laddades därtill med en utvald bakteriekultur kallad SDC9. Den var framodlad av Microbial Insights Inc. för att i aktuell livsmiljö kunna genomföra en fullständig deklorerings av PCE, TCE, DCE och VC. Efterföljande analyser av både standard Bio-Trap och avancerad Bio-Trap utfördes av Microbial Insights, Inc. Isotopanalyserna utfördes av Microseeps, Inc., USA.

Tabell 6.1 Fyra olika kolkällor (3DMe, melass, laktat och HRC) samt bakteriekultur (SDC9) laddade i fyra olika avancerad Bio-Trap provtagare och placerade i fyra olika grundvattenrör (Gv-rör).

Kolkällor och bakteriekultur tillsatta i testade avancerad Bio-Trap provtagare				
Avancerad Bio-Trap enhet/Gv-rör	GV1	GV52	GV105	GV106
MNA	-	-	-	-
BioStim	3DMe	Melass	Laktat	HRC
BioAug	SDC9 + 3DMe	SDC9 + Melass	SDC9 + Laktat	SDC9 + HRC

I det följande beskrivs tillvägagångssättet i föreliggande projekt. Resultat presenteras i efterföljande kapitel, där resultaten också jämförs med tidigare resultat från före (januari 2010) och efter (mars 2011) stimuleringen av den mikrobiella aktiviteten (oktober 2010).

6.2 Analysprogram

Inom föreliggande projekt har följande typer av analyser genomförts, främst kopplade till passiv provtagning (alla analyser, inklusive föroreningskomponenter nedan, var kopplade till olika Bio-Trap, undantaget isotopanalyserna som utfördes på vattenprov):

- Isotopanalyser (CSIA)
- Mikrobiella analyser via PLFA
- Mikrobiella qPCR-analyser av DNA-sekvenser
- Föroreningskomponenter (klorerade etener och etaner), lösta gaser, anjoner och fettsyror

Alla analyser inom projektet har utförts av Microbial Insights Inc. och Microseeps Inc., båda USA.

Utöver ovan har, som underlag för bedömning av analysprogrammet, använts resultat erhållna från WSP avseende kemanalyser av klorerade etener (analyserade av ALS Global AB), i grundvattenprov som tagits av WSP i grundvattenrör enligt WSP:s kontrollprogram, delvis parallellt med föreliggande projekt.

Tabell 6.2 sammanfattar de analyser som utförts inom föreliggande projekt i respektive provtagningspunkt kopplat till Bio-Trap, undantaget CSIA som utfördes på vattenprov. Provpunkternas lokalisering visas i Figur 6.1. Information om valda kolkällor i BioStim- och BioAug-enheterna samt bakteriekultur i BioAug-enheterna gavs i föregående avsnitt.

Alla passiva provtagare placerades ut i utvalda provpunkters grundvatten av WSP under sensvåren 2012 och togs därefter upp av WSP drygt 90 dygn senare och sändes till USA för undersökning. Utöver analys (qPCR) av DNA-baserade gensekvenser i både standard Bio-Trap (som motsvarar den mikrobiella delen av MNA-delen i avancerad Bio-Trap) och i avancerad Bio-Trap (MNA, BioStim, BioAug, se Avsnitt 3.6), analyserades PLFA (innehåll i cellmembran) i fem av sju standard Bio-Trap samt i motsvarande provtagningsdel i två av fyra avancerad Bio-Trap provtagare, Tabell 6.2. Vidare analyserades även föroreningskomponenter (klorerade etener och etaner), lösta gaser (eten, etan, metan), anjoner och fettsyror samt pH, allt kopplade till sorbenter i avancerad Bio-Trap. Därtill togs grundvattenprov ut från fyra av de sju provpunkter i vilka standard Bio-Trap var placerade samt från tre av de fyra grundvatten i vilka avancerad Bio-Trap provtagare var placerade. Dessa grundvattenprov analyserades på kolisotoper (CSIA) samt halter av klorerade etener. Sammanfattningsvis, inom projektet provtogs de punkter som anges i Figur 6.1 (sammanställda i Tabell 6.2) enligt följande:

Vattenprov till isotopanalyser (CSIA) uttogs i september 2012 från grundvattenrören GV1, GVK6, GVK8, GVK17, GV52, GV25 och GV105. Prover som användes för analys av gensekvenser (analyserade med qPCR) var kopplade till standard Bio-Trap som uttogs i september 2012. De var placerade i GVK3,

GVK6, GVK8, GVK17, GV22, GV25 och GV102. Prover som användes för analys av gensekvenser (analyserade med qPCR) i avancerad Bio-Trap (BioStim och BioAug) uttogs från GV1, GV52, GV105 och GV106 i september 2012. Prover som användes för mikrobiell bedömning via PLFA uttogs från passiva provtagare i GVK3, GVK6, GVK8, GVK17, GV1, GV25 och GV105.



Figur 6.1 Placeringar av provpunkter/grundvattenrör, provtagna inom aktuellt projekt. Orange cirklar visar grundvattenrör i vilka tester och analyser utförts, specificerat i Tabell 6.2. Foto till höger visar källområdet (under byggnaden innanför rödstreckat). Foto till vänster även riktning avbedömd föroreningsplymen. Underliggande foto med provpunkter från WSP (2010a).

Tabell 6.2 Analyser^{1/} som utförts i valda provpunkter inom det nu aktuella projektet.

Provpkt	Utrustning, provtagning	MNA	BioStim	BioAug	PLFA	CSIA
GV1	Avancerad Bio-Trap (MNA, BioStim, BioAug), PLFA, CSIA	1	1	1	1	1
GVK3	Standard Bio-Trap (delvis MNA), PLFA	1	-	-	1	-
GVK6	Standard Bio-Trap (delvis MNA), PLFA, CSIA	1	-	-	1	1
GVK8	Standard Bio-Trap (delvis MNA), PLFA, CSIA	1	-	-	1	1
GVK17	Standard Bio-Trap (delvis MNA), PLFA, CSIA	1	-	-	1	1
GV22	Standard Bio-Trap (delvis MNA)	1	-	-	-	-
GV25	Standard Bio-Trap (delvis MNA), PLFA, CSIA	1	-	-	1	1
GV52	Avancerad Bio-Trap (MNA, BioStim, BioAug), CSIA	1	1	1	-	1
GV102	Standard Bio-Trap (delvis MNA)	1	-	-	-	-
GV105	Avancerad Bio-Trap (MNA, BioStim, BioAug), PLFA, CSIA	1	1	1	1	1
GV106	Avancerad Bio-Trap (MNA, BioStim, BioAug)	1	1	1	-	-

^{1/} Alla analyser utförda på Bio-Trap av Microbial Insights Inc. USA, förutom isotopanalyser (CSIA) som utfördes på grundvattenprov av Microseeps Inc. USA. Förklaring till "delvis MNA" ges i Avsnitt 3.6.

7 Resultat och utvärdering

I detta kapitel redovisas först resultat av haltförändringar och dekloreringsgrader samt förändringar i molfraktioner före och efter biostimuleringen fram till idag för främst de delområden som föreliggande projekt fokuserat på. Underlagsdata har tagits fram av WSP och redovisas samlat i WSP (2012). Dessa data innefattar alltså tidsperiod av minst två år före, samt data som WSP tagit fram parallellt med, aktuell studie. De används i föreliggande projekt för att få en överblick och möjliggöra bedömning av de resultat som framtagits i detta projekt. I aktuellt projekt ingick inte att provta och analysera föroreningshalter i grundvattnet eftersom de ingick i det ordinarie kontrollprogram som WSP ansvarade för åt problemägaren. Ett urval av haltresultaten redovisas ändå med anledning av att de utnyttjas bl.a. vid utvärderingen av de mikrobiella analyser som ingått i projektet.

Därefter redovisas utfallet från föreliggande studie avseende dels isotopundersökningar och dels mikrobiella undersökningar med passiv provtagningsutrustning av typen standard Bio-Trap och avancerad Bio-Trap. Tillhörande analysprotokoll ges i Bilaga 9, Bilaga 6 respektive Bilaga 8.

7.1 Haltförändringar och dekloreringsgrader

I tidigare kapitel visades kartor med, av WSP interpolerad, utbredning av TCE, *cis*-DCE och VC i främst källområdet (Figureerna 4.5 till 4.7). Kartorna visade utbredningen både före och efter biostimuleringen. I följande utvärdering tas även hänsyn till beräknad dekloreringsgrad, DKG, vilken visar hur långt utvecklingen av den totala dekloreringsprocessen gått. I föreliggande fall är denna beräknad utifrån den samlade andelen och fördelningen av nedbrytningsprodukter, i förhållande till utgångsföroreningen, TCE. DKG anges i % och ju högre procentuellt värde på parametern, desto mer har de högklorerade etenerna reductivt deklorerats till lägre klorerade etener och vidare till icke-klorerade föreningar.

I avsnittet presenteras och diskuteras haltförändringar och dekloreringsgrader i vissa kontrollpunkter/grundvattenrör, som valts ut bland de som undersökts i projektet. Därefter görs detsamma för ett urval av övriga punkter. Punkterna har valts för att exemplifiera olika utvecklingsförlopp samt för att geografiskt täcka in området. Placering av provpunkterna visas i Figur 6.1. Siffror markerade med rött i tabeller nedan motsvarar värden som ligger över de platsspecifika åtgärdskraven.

GV1 är ett grundvattenrör som är centralt beläget i ursprungligt källområde. En tydlig reductiv dekloreringsring har skett i punkten efter biostimuleringen i oktober 2010, Tabell 7.1. Dekloreringsgraden har ökat, från ca 20 % före stimuleringen, till 98 % två år efter stimuleringen. Därtill uppvisar punkten en markant reduktion av den totala föroreningskoncentrationen (summan av TCE, *cis*-DCE, VC), från ca 1 400 µg/liter ½ år före, till ca 70 µg/liter två år efter, stimuleringen samtidigt som det bildats väsentligt med nedbrytningsseriens slutprodukt, eten. Under samma tid (april 2010–oktober 2012) erhöles en reduktion av molmassan/liter (motsvaras av molsumman/liter av TCE, *cis*-DCE, VC och eten) med 77 %.

Med undantag av en sista rest av VC, visar utvecklingen i GV1 sammantaget att fullständig nedbrytning skett. Initialt uppvisade TCE högsta halt, men den rollen hade i slutet av 2012 övertagits av eten. GV1 uppvisar ett ”idealt” förlopp, där man efter biostimuleringen ser en tydlig och effektiv dekloreringsring av utgångsföroreningen TCE. Redan ett år efter stimuleringen förelåg nästan endast nedbrytningsprodukter, inklusive eten. Den stora totala haltreduktionen 2012, markant ökad DKG och efter en tid den omfattande minskningen av molmassan indikerar alltså en så gott som komplett nedbrytning. Fortsatt provtagning och analys av vattnet i GV1 är dock nödvändigt för att visa om reduktionen är beständig eller om förorening återkommer (eventuell upplösning från jordmatrisen eller tillskott via inströmmade grundvatten).

Tabell 7.1 Förändring av halter och dekloreringsgrad ("Nedb.") i GV1, belägen i källområdet (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	620	710	1300	11	97	2,2	6	5,5	80	50
cDCE (µg/l)	540	740	110	2500	1200	370	7,8	13	300	200
VC (µg/l)	1,3	4,3	7,5	160	1000	570	25	51	25	15
Eten (µg/l)		<1	<1	2,6	31	144	456	526	-	-
Nedb. (%)	18	20	18	37	52	69	98	98	-	-

Det ska påpekas att efter biostimuleringen erhöles i GV1 en temporär markant ökning av molhalten av summa klorerade etener, fastän dekloreringsgraden ökade. Denna effekt har även erhållits i några andra provpunkter, beskrivna nedan. Vid en första anblick kan detta synas märkligt eftersom ökad nedbrytning av de klorerade etenerna borde minska totala molhalten av dessa. Halmätningarna görs dock endast i grundvattnet och effekten är inte unik. SGI har nyligen erfårit detsamma i ett pågående FoU-projekt. Denna temporära effekt kan eventuellt vara orsakad av ökad mikrobiell aktivitet som hypotetiskt löser ut föroreningen från den fasta akvifärmatrisen. Denna effekt skulle i så fall eventuellt kunna orsakas av fermentationen (bildade fettsyror kan agera som ytaktivt ämnen, Karanth et al., 2010) och/eller genom att organismerna utsöndrar ytaktiva ämnen för att lättare komma åt föroreningen/födan (känt för t.ex. petroleumföroreningar; Sanket & Yagnik, 2013). Fermentation och ökad mikrobiell dekloreringsaktivitet efter injektion av kolkälla kan härav hypotetiskt öka utläckage av bl.a. delvis deklorerade kloreterener från den fasta akvifärmatrisen (i GV1 t.ex. från torvlagret) ut i grundvattnet. Effekten synes avta när större delen av de klorerade etenerna i grundvattnet är fullständigt deklorerade. Under 2012 hade dekloreringen i GV1 gått så långt att även den totala molhalten av klorerade etener tydligt minskat.

GV52, Tabell 7.2, är likaledes från den centrala delen av källområdet. Vid första provtillfället efter injektionen erhöles en tydlig ökning av innehållet av TCE och *cis*-DCE. Detta kan initialt, förutom av ökad bioaktivitet, hypotetiskt ha orsakats av "mekanisk" mobilisering under injektionen och/eller att en temporär höjning av grundvattennivån då skett som kan ha orsakat kontakt med förorening i den omättade zonen.

Dekloreringsgraden ökade mycket långsamt det första halvåret efter biostimuleringen/injektionen. Dekloreringsgraden synes under senare tid ha avstannat vid *cis*-DCE och VC. I oktober 2012 var motsvarande halter de högsta som uppmätts i punkten och resultatet ger en DKG på ca 50 %.

Tabell 7.2 Förändring av halter och dekloreringsgrad ("Nedb.") i GV52, belägen i källområdet (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	20	24	190	77	47	13	210	80	50
cDCE (µg/l)	ip	10	100	800	660	930	450	1300	300	200
VC (µg/l)	ip	0,5	0,5	5,6	9	60	120	1300	25	15
Eten (µg/l)	ip	<1	<1	<1	<1	12	11	26	-	-
Nedb. (%)	ip	16	29	29	31	38	46	52	-	-

ip = ingen provtagning

Den markant ökande totala molkoncentrationen i slutet av 2012 kan vara temporär, hypotetiskt orsakad av t.ex. ökad mikrobiell aktivitet som ökat lösligheten av de aktuella klorerade etenerna ut i vattenfasen eller tillfällig tillförsel uppströms ifrån. Uppföljning av denna punkt bör göras för att klargöra om ökningen är temporär eller inte, samt bakomliggande orsak till denna totala haltökning.

GVK6, placerad centralt i källområdet, uppvisar initialt ökad dekloreringsgrad, från 23 % till 54 %, Tabell 7.3, men hade under slutet av 2012 sjunkit till 40 %. Den totala föroreningskoncentrationen per liter vatten ökade från juni 2012 till oktober 2012, därtill var koncentrationen av ursprungsprodukten TCE åter hög. Orsaken till detta är inte klarlagd men skulle hypotetiskt kunna bero på att mikrobiell aktivitet frigjort förorening och delvis deklorerade produkter från jordmatrisen, att rörelser/vibrationer i jorden (t.ex. tyngre maskiner) fysiskt frigjort förorening till grundvattnet och/eller att förorening i äldre installationer frigjorts.

Slutsatsen är att GVK6 framledes är viktig att provta och analysera med tät frekvens för att följa föroreningsutvecklingen (ev. tas dubbelprover för att bekräfta den avvikande utvecklingen). Den fortsatta utvecklingen i GVK6, bedömd tillsammans med andra resultat och mätningar, avgör om kompletterande biostimulering genom injektion av kolkälla, samt eventuellt också injektion med mikroorganismer, behövs.

Tabell 7.3 Utveckling av föroreningshalt och dekloreringsgrad ("Nedb.") i provpunkt GVK6, centralt belägen i källområdet (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	3200	1100	460	150	18	24	960	80	50
cDCE (µg/l)	ip	970	1500	3400	4700	2500	2300	4900	300	200
VC (µg/l)	ip	1,5	2,9	25	15	1700	1400	1100	25	15
Eten (µg/l)	ip	9	8	24	5	72	121	59	-	-
Nedb. (%)	ip	11	2,3	33	33	53	54	40	-	-

ip = ingen provtagning

GV25 är belägen i nedre delen av källområdet. Provpunkten uppvisar en markant ökad dekloreringsgrad, från 33 % ca ½ år före biostimuleringen till 94 % två år efter stimuleringen, Tabell 7.4. Samtidigt ses en tydlig reduktion av den totala föroreningskoncentrationen (summan av TCE, *cis*-DCE, VC) som förändrats från ca 610 µg/l ca ½ år före biostimuleringen till ca 40 µg/l ca två år efter. På samma gång har signifikant halt av den oskadliga slutprodukten eten bildats (99 µg/l).

Tabell 7.4 Utveckling av föroreningshalt och dekloreringsgrad ("Nedb.") i provpunkt nedströms källområdet, GV25 (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	110	19	54	6,8	2,2	1,1	3,6	80	50
cDCE (µg/l)	ip	470	590	370	81	47	2,9	10	300	200
VC (µg/l)	ip	9,7	3,4	290	110	220	33	28	25	15
Eten (µg/l)	ip	<1	<1	7	12	38	143	99	-	-
Nedb. (%)	ip	30	33	49	60	71	96	94	-	-

ip = ingen provtagning

Om man beräknar förändring i total molmassa av analyserade klorerade etener per liter fås att mellan april 2010–maj 2011 samt mellan april 2010–juni 2012 minskade denna med ca 60 % resp. ca 90 %. Kopplas detta till dekloreringsgradens förändring fås att i maj 2011 pågick främst deklorering till lågklorerade etener medan i juni 2012 hade slutfasen tydligt börjat då totala molmassan signifikant minskat samtidigt som VC deklorerades signifikant.

Sammantaget visar utvecklingen i GV25 att nedbrytningen är långt gången. En fortsatt nedbrytning av främst VC förväntas ske inom de närmaste månaderna.

I det följande ges information om tre provpunkter placerade i plymen nedströms källområdet. De ingår i en grupp som är placerade längs en transekt mot grundvattenriktningen. Vid utvärdering bör beaktas att detta plymområde indirekt kan ha blivit påverkat av den mikrobiella stimulering som avsågs i källområdet samt de i källområdet bildade nedbrytningsprodukterna. Resultat från provtagning i plymen och i källan bör sammantaget värderas, med beaktande av den samlade föroreningsfluxen ut från källområdet samt som dokumentation av saneringseffekten.

GV102 är belägen i plymen ca 40 m nedströms källområdet. I punkten låg den samlade koncentrationen av TCE, *cis*-DCE och VC på ungefär samma nivå (300-360 µg/liter), ca ½ år före, som ca 2 år efter, biostimuleringen, Tabell 7.5. Även dekloreringsgraden (DKG) var under denna period i stort oförändrad, från 34 % till 38 %.

Efter biostimuleringen synes dekloreringen ha varit marginell. Vad som orsakat att ökningen av DKG endast blivit marginell kan undersökas närmare med t.ex. mikrobiella analyser och isotopanalyser. Man bör beakta vid värdering att GV102 är belägen i kanten av plymen och därmed utsatt för lokala förändringar utanför plymen.

Tabell 7.5 Utveckling av föroreningshalt och dekloreringsgrad ("Nedb.") i provpunkt GV102 i plymen, belägen ca 40 m nedströms källområdet (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	ip	64	ip	8,6	11	3,1	80	50
cDCE (µg/l)	ip	ip	270	ip	140	320	270	300	200
VC (µg/l)	ip	ip	18	ip	1,8	21	31	25	15
Eten (µg/l)	ip	ip	3	ip	<1	<1	<1	-	-
Nedb. (%)	ip	ip	34	ip	33	36	38	-	-

ip = ingen provtagning

GV105, som är belägen ca 40 m nedströms källområdet, uppvisar en avsevärd ökning av dekloreringsgraden två år efter, jämfört med ½ år före, biostimuleringen. Dock har denna ökning i princip skett mellan juni 2012 - oktober 2012, Tabell 7.6. Halten VC ökade markant från maj 2011 till oktober 2011, varefter den temporärt sjönk fram till juni 2012, med en efterföljande höjning igen fram till oktober 2012.

Molmassan av klorerade etener per liter ökade marginellt (10 %) ca ½ år efter biostimuleringen, jämfört med ca ½ år före densamma (dvs. maj 2011 jämfört med april 2010). I oktober 2011 var denna ökning 37 %. Därefter minskade molmassan med 51 % mellan oktober 2011 och juni 2012, varefter den ökade igen dock marginellt med 12 % mellan juni 2012 och oktober 2012.

Dessa oregelbundna förändringar skulle kunna tolkas så att punkten till betydande del är påverkad av oregelbundna flöden, framför allt från källområdet samt eventuell nedbrytning dels i punkten, dels under transport från källområdet till punkten. Detta bör kunna klargöras genom jämförelse med vanliga fältdata (redox, elektrisk konduktivitet, m.m.) samt med t.ex. mikrobiella undersökningar. Det skulle hypotetiskt alternativt kunna vara så att mikrobiell aktivitet (fermentationen, metanogenesis och/eller dekloreringen) ökar lösligheten av förorening från jordmatris till vattenfas. Exempelvis ökade nedbrytningen, indikerat av förändring av DKG, från 30 % till 39 % mellan maj och oktober 2011, samtidigt som totala molmassan av de analyserade klorerade etenerna per liter ökade med 37 %. Mellan juni 2012 och oktober 2012 ökade DKG från 35 % till 66 %, samtidigt som molmassan ökade under samma period med 11 %.

Dekloreringsgraden ökade alltså markant under de senaste månaderna (juni 2012–oktober 2012). Samtidigt skedde det en tydlig haltökning av VC och eten samt minskning av halten *cis*-DCE. Detta tyder på att fullständig reduktiv deklorering (nedbrytning i alla dekloreringssteg) skedde, antingen i, eller uppströms punkten.

Tabell 7.6 Utveckling av föroreningshalt och dekloreringsgrad ("Nedb.") i provpunkt GV105 i plymen, belägen ca 40 m nedströms källområdet (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	ip	160	ip	160	95	35	2,9	80	50
cDCE (µg/l)	ip	ip	880	ip	980	1000	640	320	300	200
VC (µg/l)	ip	ip	3,8	ip	4,6	200	6,2	280	25	15
Eten (µg/l)	ip	ip	<1	ip	<1	2,7	5,9	88	-	-
Nedb. (%)	ip	ip	30	ip	30	39	35	66	-	-

ip = ingen provtagning

GV106 är även den placerad i plymen ca 40 m nedströms källområdet. Som framgår av Tabell 7.7 hade det ca sju månader efter biostimuleringen (som utfördes oktober 2010) inte skett någon förändring i DKG, ej heller i den samlade föroreningshalten. Efter denna provtagningstidpunkt skedde en "puls" av VC, som skulle kunna bedömas vara en påverkan från den stimulerade dekloreringsprocessen i källområdet.

Det bör noteras att etenhalterna var mycket låga, trots att eten påvisats i de uppströms liggande källområdet. VC-halten var återigen låg i juni 2012, hypotetiskt till del orsakat av uppbromsad reduktiv deklorering av *cis*-DCE. Viss deklorering av VC till eten synes därtill ha skett under denna tid eftersom eten för första gången detekterades. Vid senaste provrundan erhöles en minskning av den samlade molbaserade föroreningskoncentrationen i provpunkten, jämfört med föregående provtagning. Men fastän totala molmängden minskade så minskade även dekloreringsgraden. Hypotetiskt kan de lågklorerade etenerna samt eten alternativt till del ha oxiderats (se Avsnitt 8.5).

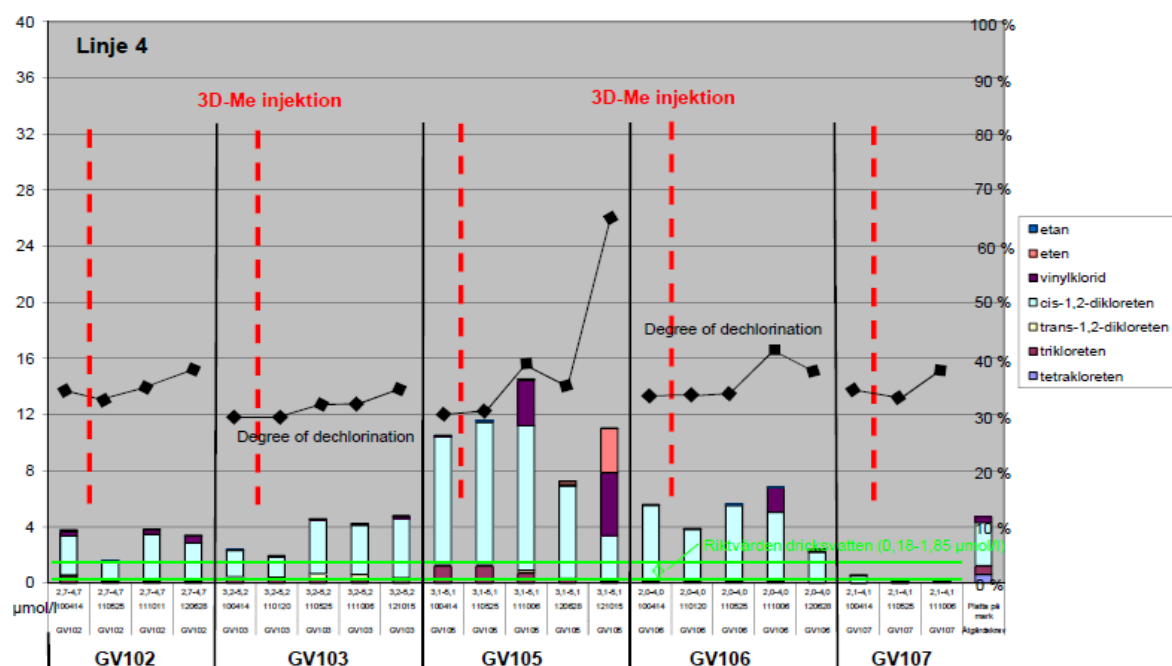
Tabell 7.7 Utveckling av dekloreringsgrad (Nedb.) samt haltförändringar i GV106 (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	ip	6,4	11	12	8,4	2,7	80	50
cDCE (µg/l)	ip	ip	520	350	510	460	210	300	200
VC (µg/l)	ip	ip	0,5	0,5	5,3	110	0,5	25	15
Eten (µg/l)	ip	ip	<1	<1	<1	<1	5	-	-
Nedb. (%)	ip	ip	33	33	33	42	38	-	-

ip = ingen provtagning

Figur 7.1 visar utvecklingen av DKG och föroreningshalterna sammantaget i alla provpunkter placerade transekt i plymen ca 40 m nedströms källområdet (i vilket det skedde en biostimulering 2010 via 3DMe injektion). Tid för stimuleringen anges som röstreckade linjer.

Som framgår av nämnda figur har det skett en begränsad utveckling av % DKG, undantaget i GV105 i vilken en markant ökning av DKG kan ses. Likaledes är föroreningsnivåerna varierande, men generellt på ungefär samma nivå och det finns inga tecken på en "systematisk" reduktion.



Figur 7.1 Sammanställning av tidsberoende förändring av DKG och föroreningskoncentrationer i fem provpunkter placerade vinkelrät föroreningsens spridningsriktning ca 40 m nedströms källområdet. Den högra y-axeln (%) är relaterad till DKG och den vänstra y-axeln ($\mu\text{mol} / \text{liter}$) till koncentration (WSP, 2012).

Sammanställningen i Figur 7.1 av DKG och föroreningskoncentrationer ger en god bild av utvecklingen i beskriven punkt, dvs. huruvida den reduktiva dekloreringen är signifikant eller inte. Sammanställer man flera punkter på det sätt som visas i figuren, fås en solid grund för utvecklingen av saneringen, samt underlag för eventuella justeringar av åtgärder. Det är viktigt att det finns relevant underlag och dokumentation av huruvida saneringen fortlöper tillfredsställande i förhållande till uppställda saneringskrav. Presentation enligt Figur 7.1 ger en viktig del i sådant underlag.

Utöver ovan beskrivna provpunkter, som på något sätt har ingått i föreliggande projekt, ges nedan information för två övriga punkter, båda belägna något ovanför (i grundvattnets riktning), eller i den absoluta övre delen av, källområdet.

GVK24, Tabell 7.8, visar obetydlig ändring i DKG upp till ett år efter biostimuleringen i oktober 2010, från 24 % ca ½ år före till 28 % ett år efter stimuleringen. Slutsats är att det under denna tid inte skedde någon avsevärd reduktiv deklorering i detta område. Eventuellt har punkten inte erhållit tillräckligt med kolkälla.

Tabell 7.8 Utvecklingen av dekloreringsgrad ("Nedb.") samt halfförändringar i GVK24 (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE ($\mu\text{g/l}$)	ip	430	480	160	60	150	80	50
cDCE ($\mu\text{g/l}$)	ip	460	880	770	750	590	300	200
VC ($\mu\text{g/l}$)	ip	1,1	0,5	1,5	<1	<1	25	15
Eten ($\mu\text{g/l}$)	ip	4	<1	<1	<1	<1	-	-
Nedb. (%)	ip	21	24	29	31	28	-	-

ip = ingen provtagning

GVK25 är även denna belägen något ovanför, eller i den absoluta övre delen av, källområdet. Punkten uppvisar en tydlig utveckling av dekloreringsgrad, från 33 % ett ½ år före, till 69 % ett år efter biostimuleringen, Tabell 7.9. Under samma period minskade den totala molmässiga föroreningskoncentrationen. Observera dock att dekloreringsgraden (DKG) temporärt minskade markant i maj 2011. Detta beror till stor del på att etenhalten då låg under detektionsgräns. Det kan inte uteslutas att den markanta minskning av eten som temporärt skett kan ha berott på att eten brutits ned oxidativt.

Den totala molmassan av klorerade etener hade minskat med 37 % i januari 2011, jämfört med situationen ca ½ år (april 2010) före biostimuleringen. I oktober 2011 hade molmassan minskat med 80 %, jämfört med i april 2010 (dvs. ca ½ år före biostimuleringen), samtidigt som DKG dubblerats. Detta indikerar sammantaget att dekloreringen tydligt ökat efter biostimuleringen. Emellertid, under januari 2011 - maj 2011 minskade DKG temporärt, från 62 % till 35 %. Detta skulle hypotetiskt kunna tyda på t.ex. att en del av de lågklorerade etenerna temporärt oxiderats (Avsnitt 8.5). Bortsett från situationen i maj 2011 följer utveckling av dekloreringsgrad och total föroreningskoncentration i GVK25 ett förväntat mönster för områden där den mikrobiella dekloreringen stimulerats.

Tabell 7.9 Utveckling av föroreningshalt och dekloreringsgrad ("Nedb.") i provpunkt GVK25, i övre delen av källområdet (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	260	150	3	1,6	1,1	80	50
cDCE (µg/l)	ip	270	550	260	160	120	300	200
VC (µg/l)	ip	3,7	66	140	6,5	21	25	15
Eten (µg/l)	ip	<1	<1	51	<1	42	-	-
Nedb. (%)	ip	21	33	62	35	69	-	-

ip = ingen provtagning

I Tabell 7.10 visas en sammanställning av utvecklingen av DKG före och efter biostimuleringen 2010, för alla provtagna punkter. Nederst i tabellen ges genomsnittsvärden samt max/min värden av DKG, från en given provtagningsskiftning.

Som framgår skedde det från april 2008 till april 2010 (2-årigt intervall före biostimuleringen) en ökning av DKG med ca 10 % i medel. Mellan 2010 till idag (ca 2-årigt intervall med början ca ½ år före biostimuleringen) ökade DKG i medel från ca 30 % till ca 60 %. Skillnaden hänger naturligt samman med biostimuleringen. Ser man endast på medelvärden av DKG för källområdet så är denna ökning ännu större. Men för källområdet ses vid senaste provtagning en begynnande nedgång i medel % DKG, vilket till stor del beror på den överaskande utvecklingen i GVK6, se Tabell 7.3.

Som framgår av tabellen, och som också är beskrivet ovan, är det stora skillnader i utvecklingen av DKG. Orsakerna kan hypotetiskt ha olika ursprung (flera har nämnts ovan) och styrka beroende på om punkterna ligger i källområdet eller i plym.

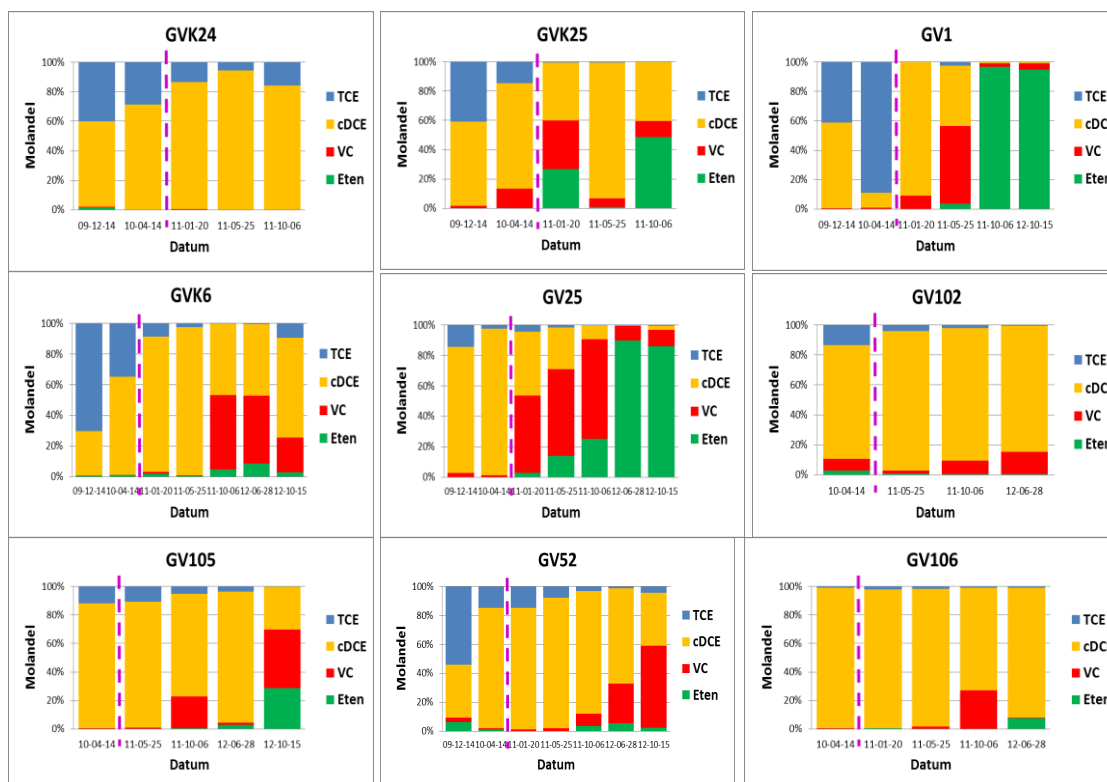
Tabell 7.10 Tidsberoende utveckling av dekloreringsgrad före och efter biostimuleringen i oktober 2010 (röd linje). Data från WSP (2012). Provpunkterna är listade vertikalt så som de är placerade i fält från översta del av källområdet ned till plymen. GV102–GV107 är placerade transekt i plymen. Angivna värden i %-enheter.

ProvpktDatum	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015
GVK25	-	21	33	62	35	69	-	-
GV2	23	33	32	37	-	-	-	-
GVK24	-	24	24	29	31	28	-	-
GVK3	-	22	26	32	34	36	-	52
GV52	-	16	29	29	31	38	46	52
GV1	18	20	18	37	52	69	98	98
GVK8	-	26	24	30	32	31	50	56
GVK6	-	11	23	33	33	53	54	40
GVK19	-	45	40	86	91	96	-	-
GV25	-	30	33	49	60	71	96	94
GVK17	-	40	63	65	62	63	64	-
GV22	-	22	31	25	46	63	77	-
GV102	-	-	34	-	33	36	38	-
GV103	-	-	30	30	32	32	-	34
GV105	-	-	30	-	30	30	35	66
GV106	-	-	33	33	33	42	38	-
GV107	-	-	34	-	33	37	-	-
Medel	21	26	32	40	42	48	60	62
Median	21	23	31	33	33	40	52	54
Min/max	18 / 23	11 / 45	18 / 63	25 / 86	30 / 91	28 / 96	35 / 98	34 / 98

7.2 Förändring i molfraktioner

Visualisering av molfraktioners förändring över tiden ger en viktig överblick över den pågående reductiva dekloreringen. Figur 7.2 till Figur 7.10 beskriver denna utveckling över tid för nio provpunkter. Diagrammen ger i de flesta exemplifierade fallen en tydlig beskrivning av ökad nedbrytning efter biostimuleringen 2010 (violettera streck).

Jämförs utveckling av halter, exemplifierat med GV52 i Tabell 7.11 (kopia av Tabell 7.2), med utvecklingen av molfraktioner i samma punkt, exemplifierat i Figur 7.11 (uppförstorad Figur 7.9), framkommer styrkan i att presentera molfraktionerna. Vid en första anblick i Tabell 7.11 synes halterna öka med tiden samt eventuellt att ingen markant nedbrytning sker. Figur 7.11 visar dock tydligt att fastän halterna ökar över tid i provpunktens grundvatten så sker där samtidigt en markant nedbrytning.

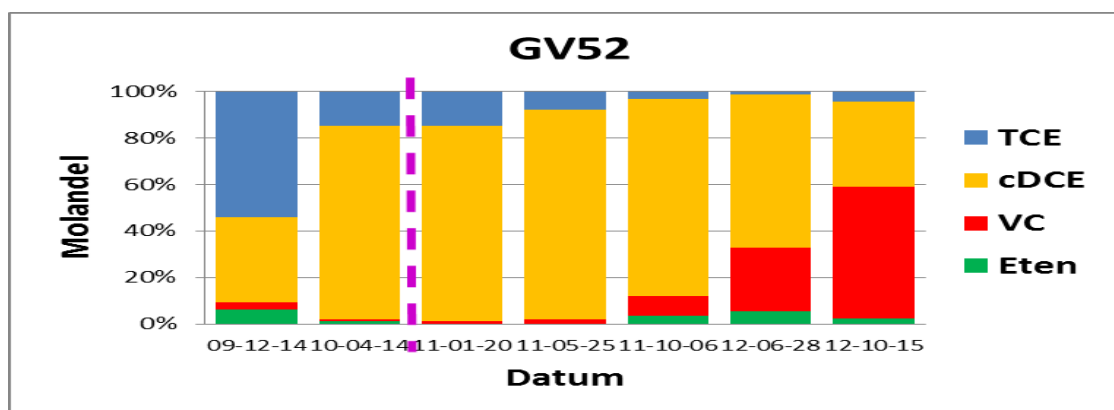


Figur 7.2 till 7.10 Utveckling av molfraktioner i nio grundvattenrör över tid (violetta streck: biostimulering).

Tabell 7.11 Utveckling av halförändringar och dekloreringsgrad ("Nedb.") i GV52 (WSP, 2012).

Ämne	080418	091214	100414	110120	110525	111006	120628	121015	Riktvärde platta	Riktvärde källare
TCE (µg/l)	ip	20	24	190	77	47	13	210	80	50
cDCE (µg/l)	ip	10	100	800	660	930	450	1300	300	200
VC (µg/l)	ip	0,5	0,5	5,6	9	60	120	1300	25	15
Eten (µg/l)	ip	<1	<1	<1	<1	12	11	26	-	-
Nedb. (%)	ip	16	29	29	31	38	46	52	-	-

ip = ingen provtagning



Figur 7.11 Utveckling av molfraktioner i GV52 över tid (violett streck: injektion).

Tabell 7.12 $\delta^{13}\text{C}$ värden (‰), analyserade vid tre tillfällen mellan 2010-2012 i grundvattenprov från olika provpunkter. Data för december 2009 och januari 2011 från WSP (2012). Data från september 2012 enligt protokoll i Bilaga 9.

Förening ^{1/}	Tid	GV1	GVK6	GVK17	GVK24	GVK8	GV52	GV25	GV105
TCE (före)	Dec 2009	-5,9	-13,8	-11,9	-14,8	B/	B/	B/	B/
TCE (efter)	Jan 2011	A/	-0,11	-6,5	-4,7	B/	B/	B/	B/
TCE (efter)	Sep 2012	A/	-7,2	A/	B/	-8,6	-7,0	A/	A/
<i>cis</i> -DCE (före)	Dec 2009	-31,2	-27,8	-18,1	-21,1	B/	B/	B/	B/
<i>cis</i> -DCE (efter)	Jan 2011	-17,3	-22,6	-7,1	-24,6	B/	B/	B/	B/
<i>cis</i> -DCE (efter)	Sep 2012	-8,0	-6,6	A/	B/	-9,2	-13,7	-4,5	-6,8
VC (före)	Dec 2009	-42,9	A/	-40,4	A/	B/	B/	B/	B/
VC (efter)	Jan 2011	-22,0	-30,9	-22,4	A/	B/	B/	B/	B/
VC (efter)	Sep 2012	3,5	-17,6	-17,8	B/	-27,3	-20,1	-10,6	-11,2

1/ "före" = före injektion av kolkälla; "efter" = efter injektion av kolkälla.

A/ Halt av förening under detektionsgräns.

B/ Ej analyserat.

7.3.3 Resultat och utvärdering, enskilda provpunkter

Isotopbaserade förhållanden mellan C_t/C_0 för de provpunkter som undersökts dels i föreliggande projekt, dels tidigare av WSP, anges i Tabell 7.13 till Tabell 7.16.

Förhållandet C_t/C_0 beräknas med Ekvation 16 i Bilaga 1. För beräkningarna krävs bl.a. platsspecifikt värde på den stabila isotopa anrikningsfaktorn, ϵ . Förutsatt att nedbrytningen följer Rayleighs ekvation (Ekvation 4, Bilaga 1) så kan denna anrikningsfaktor beräknas utifrån laboratorievärden på $\delta^{13}\text{C}_0$ och $\delta^{13}\text{C}_t$ (Ekvation 6 och Ekvation 7 i Bilaga 1). I föreliggande fall har ingen sådan laboratoriestudie utförts på ursprunglig förening. Underlag för val av lämplig platsspecifikt anrikningsfaktor har då sökts i litteraturen enligt följande.

Undersökning av mikrobiell status har utförts i flertal provpunkter, bl.a. i prov taget i GVK6 i september 2012 (se avsnitt nedan). I punkten detekterades en betydande population av *Dehalobacter spp.* ($1,19 \cdot 10^6$) och *Dehalococcoides spp.* ($6,04 \cdot 10^5$). Halterna av dessa var betydande även 2011, framför allt för den förra populationen ($3,26 \cdot 10^6$ respektive $8,32 \cdot 10^2$). I US EPA (2008) anges att ϵ -värden mellan -3,3 % till -9,6 % har i de allra flesta fall erhållits kopplade till dessa typer/ populationer av mikroorganismer. I föreliggande fall ansätts härav det viktade medelvärde $\epsilon = -5,4$ % att grovt gälla primärt för provpunkt GVK6, härav definierad nedan som referenspunkt, relativt till övriga isotopundersökta provpunkter.

GVK6 är en provpunkt som är belägen centralt i källområdet. Av Tabell 7.13 fås att $\delta^{13}\text{C}$ (TCE) i GVK6 ökade kraftigt, från att ha varit -13,8 ‰ före injektionen (som skedde oktober 2010) till -0,11 ‰ ca ½ år efter injektionen. Detta tyder på en markant ökad nedbrytning av TCE, sannolikt orsakat av injektionen. Därefter minskade värdet till -7,2 ‰, detekterat två år efter injektionen.

Förändring i haltförhållandet DCE/TCE samt i $\delta^{13}\text{C}$ (TCE), Tabell 7.13, indikerar att det inte skett något betydande inflöde av ursprunglig förening upp till ca ½ år efter injektion (både $\delta^{13}\text{C}$ (TCE) och DCE/TCE ökade vs. före injektion). Däremot synes visst inflöde av TCE skett under de efterföljande 1,5 åren, då både $\delta^{13}\text{C}$ (TCE) och DCE/TCE under den tiden minskade (dvs. $\delta^{13}\text{C}$ (TCE) uppvisade större minusvärde). Minskningen av $\delta^{13}\text{C}$ (TCE) indikerar att inkommande TCE haft sitt ursprung i ett område där nedbrytningen gått långsammare än i punkten GVK6. Baserat på bedömd flödesriktning skulle detta i så fall motsvara område kring GV52 och/eller GVK24.

Tabell 7.13 Jämförelse av tidsberoende isotopbaserade halförändringar och koncentrationsbaserade halförändringar i provpunkt GVK6. Isotopdata och haltvärden för december 2009 och januari 2011 från WSP (2012) och för september 2012 från analysprotokoll i Bilaga 9. Alla isotop- och haltanalyser utförda av Microseeps, Inc.

Provpkt	Datum	DCE µg/l	TCE µg/l	$\delta^{13}\text{C}$ (TCE)	ϵ	C_t/C_0	DCE/TCE
GVK6	Dec 2009	2000	3000	-13,8	-5,4	0,83	0,67
GVK6	Jan 2011	3600	330	-0,11	-5,4	0,07	10,9
GVK6	Sep 2012	1600	220	-7,18	-5,4	0,25	7,3

GV52 och **GVK24** är horisontellt sett belägna i, respektive i den absoluta övre delen av, källområdet. I Tabell 7.14 ges situationen för dessa två punkter. Komplet information över tid för dessa punkter föreligger inte. För punkt GV52 är orsaken att denna inte undersöktes m.a.p. isotop-sammansättningen före föreliggande undersökning. Punkten GVK24 var planerad att provtas under hösten 2012 men det uppkom problem med tillträde till byggnaden i vilken punkten finns som gjorde att provtagning i punkten då fick inställas. Värden för GVK24 föreligger dock från tidigare undersökningar, redovisade i nämnda tabell.

Av Tabell 7.14 framgår att det idag pågår signifikant nedbrytning av TCE i GV52 (krav $\delta^{13}\text{C} > -20\%$, Bilaga 1). Vidare, i punkt GVK24 ökade nedbrytningen av TCE markant under ett antal månader efter injektionen, vilket indikeras av värdena för $\delta^{13}\text{C}$ och DCE/TCE. Huruvida denna ökning har fortsatt i punkten kan inte klargöras (inga data).

Jämförs Tabell 7.13 med Tabell 7.14 fås att förhållandet DCE/TCE samt $\delta^{13}\text{C}$, båda gällande GVK24, är lägre än i GVK6 under motsvarande tid. Därtill är motsvarande värden för GV52 i september 2012 av samma storleksordning som för nedströms belägna provpunkten GVK6. Detta styrker hypotesen ovan att TCE uppströms GVK6 under senare tid kan ha kommit in i denna punkt.

Tabell 7.14 Jämförelse av tidsberoende isotopbaserade halförändringar och koncentrationsbaserade halförändringar i provpunkt GVK24 samt status i GV52 vid senaste provtagningen september 2012. Isotopdata och haltvärden för december 2009 och januari 2011 från WSP (2012) medan från september 2012 från analysprotokoll i Bilaga 9. Alla isotop- och haltanalyser utförda av Microseeps, Inc.

Provpkt	Datum	DCE µg/l	TCE µg/l	$\delta^{13}\text{C}$ (TCE)	ϵ	C_t/C_0	DCE/TCE
GV52	Sep 2012	740	160	-6,98	-5,4	0,24	4,6
GVK24	Dec 2009	600	800	-14,8	-5,4	1	0,75
GVK24	Jan 2011	660	200	-4,68	-5,4	0,15	3,3

GVK17 är belägen nedströms GVK6. Resultat för GVK17 ges i Tabell 7.15. Halterna av TCE och DCE har minskat till att idag vara under detektionsgräns (härav kunde inga isotopvärden erhållas). Även trenden av ökande värden för $\delta^{13}\text{C}$ före och efter injektionen styrker att utfallet skulle kunna bli vad som nu erhållits, dvs. att TCE och DCE nu är under detektionsgräns.

Tabell 7.15 Jämförelse av tidsberoende isotopbaserade halförändringar och koncentrationsbaserade halförändringar i provpunkt GVK17 (december 2009 före, och januari 2011 och september 2012 efter, injektion). Isotopdata och haltvärden för december 2009 och januari 2011 från WSP (2012) medan från september 2012 från analysprotokoll i Bilaga 9. Alla isotop- och haltanalyser utförda av Microseeps, Inc.

Provpkt	Datum	DCE µg/l	TCE µg/l	$\delta^{13}\text{C}$ (TCE)	ϵ	C_t/C_0	DCE/TCE
GVK17	Dec 2009	700	80	-11,86	-5,4	0,58	8,75
GVK17	Jan 2011	4,2	1	-6,46	-5,4	0,21	4,2
GVK17	Sep 2012	<5	<5	-	-	-	-

GV1, GVK8 och **GV25** är dels placerade i övre delen av källområdet (GV1 och GVK8), dels nedströms källområdet (GV25). I Tabell 7.16 redovisas resultat för dessa tre punkter.

I GV1 var TCE-halterna alltför låga ca ½ år efter biostimuleringen (dvs. i januari 2011) för att $\delta^{13}\text{C}$ (TCE) skulle kunna fastställas. Detta gäller även för provpunkt GV25 under provomgång 2012. Resultaten pekar dock på tydlig nedbrytning av TCE före december 2009 (relativt högt $\delta^{13}\text{C}$ (TCE)). Därtill kan den markant lägre TCE-halten under 2011 och 2012, jämfört med i början av 2010, vara en indikation på att TCE brutits ned. Detta har också visats i tidigare avsnitt via utveckling av molfraktionsfördelning och dekloreringsgrad (Figur 7.4 och Tabell 7.1).

I den närliggande punkten GVK8 har nedbrytningen inte gått lika långt men uppvisar likheter med dess närliggande punkt GVK6. Föroreningsutbredningen horisontellt tyder på att halterna i övre delen av det förorenade området ökar i riktning mot GVK6. I den nedströms liggande punkten GV25 var halterna av TCE vid senaste provtillfället så låga att isotopkvoter inte kunnat bestämmas.

Tabell 7.16 Jämförelse av tidsberoende isotopbaserade halförändringar och koncentrationsbaserade halförändringar i provpunkt GV1 samt status i GV25 och GVK8 vid senaste provtagningen september 2012. Isotopdata och haltvärden för december 2009 och januari 2011 från WSP (2012) medan från september 2012 från analysprotokoll i Bilaga 9. Alla isotop- och haltanalyser utförda av Microseeps, Inc.

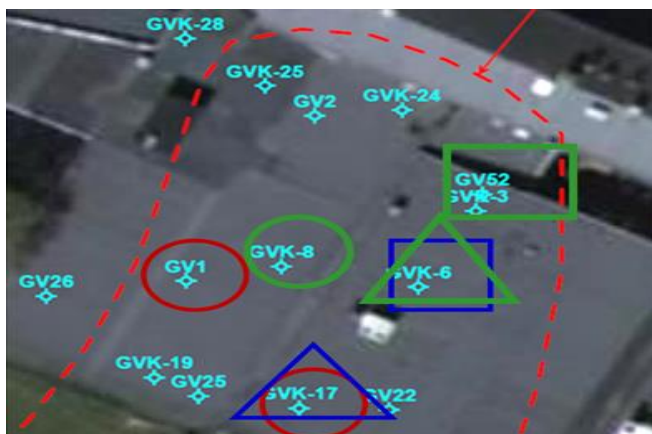
Provpkt	Datum	DCE µg/l	TCE µg/l	$\delta^{13}\text{C}$ (TCE)	ϵ	C_t/C_0	DCE/TCE
GV1	Dec 2009	2000	2000	-5,93	-5,4	0,19	1,0
GV1	Jan 2011	1400	3,3	-	-	-	424
GV1	Sep 2012	14	5	-	-	-	2,8
GVK8	Sep 2012	630	24	-8,56	-5,4	0,32	26,3
GV25	Sep 2012	24	<5	-	-	-	-

7.3.4 Bakgrundsvärde och massbalans för bedömning av fullständig deklorering

En viktig målsättning med förstärkt självrening av klorerade etener är att VC bryts ned. Enbart haltninskning av VC kan bero på enbart fysikaliska effekter (utspädning, avgång till luft i samband med provtagning, m.m.). Detektering av eten ger naturligtvis direkt bevis på nedbrytning av VC, men även om eten inte detekterats så kan eten ändå ha producerats genom deklorering av VC, varefter eten kan ha brutits ned.

Om eten inte detekterats kan isotopundersökningar ge bevis på huruvida VC deklorerats till eten (Aeppli et al., 2010). För beräkningarna behövs molvikterna (TCE 131,38 µg/µmol; DCE 96,94 µg/µmol; VC 62,50 µg/µmol), analyserade halter samt motsvarande isotopkvotvärden för de aktuella föreningarna. Data för de sistnämnda ges i Pirkle (2006).

För bedömning av nedbrytning av VC krävs jämförelse med bakgrundsvärde av $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ (‰) som motsvarar ofullständig nedbrytning, dvs. att VC inte brutits ned (Aeppli et al., 2010). Sannolikheten för relevant bakgrundsvärde bör vara större före injektion, jämfört med efter injektion. De isotopvärden som föreligger, Figur 7.13 och Tabell 7.17, är få vilket gör bedömning av relevant bakgrundsvärde för $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ (‰) osäker. Av de fem grundvattenrör som provtogs före injektionen för isotopanalyser, uppvisade endast GV1 och GVK17 både halter av klorerade etener och isotopvärden som kunde säkerställas.



Figur 7.13 Markerade grund-vattenrör i vilka massbalanser för alla klorerade etener har kunnat beräknas baserat på befintliga isotopdata. Rödmärkade rör provtagna före injektion av kolkälla, blå ca 0,5 år efter och gröna provtagna ca 2 år efter injektion av kolkälla. Underliggande foto med provpunktsplaceringar från WSP (2010a).

För att kunna beräkna börjar man inledningsvis anta dels 1/ att data för detekterade etenhalter inte föreligger, dels 2/ att förhållandena före injektion borde vara mindre fördelaktiga för VC nedbrytning, jämfört med efter injektion och dels 3/ att det skulle kunna fastställas utifrån fler isotopanalyser att det i GV1 före injektion inte skett någon signifikant nedbrytning av VC (hur detta principiellt kan göras med betydligt fler mätdata ges i Aeppli et al., 2010).

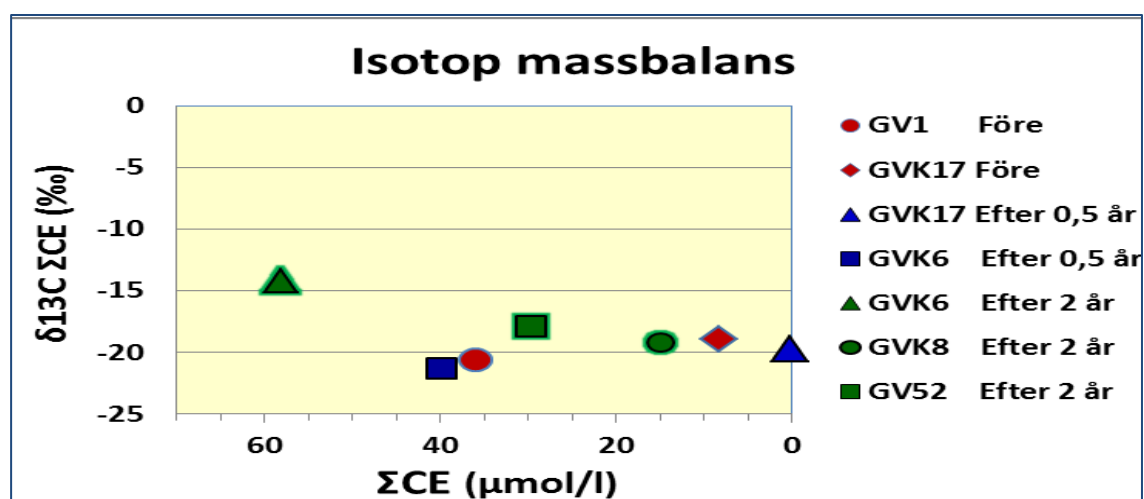
Baserat på analysdata angivna i Tabell 7.17 samt användande av Ekvation 23 i Bilaga 1, fås att $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -20,6 \text{ ‰}$ i GV1 före injektion (Tabell 7.17). Detta värde skulle då eventuellt kunna motsvara ett bakgrundsvärde för vilket inget VC brutits ned. Om värdet på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ kan visas vara signifikant större i annan punkt skulle det vara bevis på fullständig nedbrytning, dvs. att VC signifikant brutits ned i sådan punkt.

Nu föreligger dock alltså alltför få värden för att värdet $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -20,6 \text{ ‰}$ ska kunna giltigförklaras som bakgrundvärde. Värdet är troligtvis alltför högt. Några månader efter injektionen uppvisade punkten GVK6 ännu lägre $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ ($-21,3 \text{ ‰}$), Tabell 7.17 och diagrammässigt beskrivet i Figur 7.14. Denna punkt uppvisade samtidigt betydande halt eten ($24 \text{ } \mu\text{g/l}$, Tabell 7.18), vilket bör vara en god indikation på fullständig nedbrytning i denna punkt. Detta kan indikera att också värdet $-21,3 \text{ ‰}$ är alltför högt för att motsvara bakgrundvärde för $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$. Detta styrks av att värdet på $\delta^{13}\text{C}$ för TCE samtidigt var $-0,11 \text{ ‰}$, att jämföra med värdet för ursprunglig TCE som normalt ligger i storleksordningen $< -22 \text{ ‰}$ till $< -26 \text{ ‰}$ (Bilaga 1).

Resultaten indikerar att fullständig deklorering (dvs. nedbrytning i alla steg ned till produktion av eten) fortsatt skett i GVK6 ca två år efter injektion. Detta kan baseras på dels att punkten hade högsta värdet på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ ($-14,2 \text{ ‰}$), Figur 7.14, samt dels på den signifikanta etenhalten som detekterades i samma punkt vid samma tillfälle, Tabell 7.18.

Tabell 7.17 Värden på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ beräknade ur halt- och isotopdata. Provpunktplaceringar ges i Figur 7.13. Resultaten visas diagrammässigt i Figur 7.14. Färgade rutor i denna tabell indikerar tidpunkt och motsvaras av samma färg i Figur 7.13 och Figur 7.14. Isotopdata och haltvärden för december 2009 och januari 2011 från WSP (2012) medan från september 2012 från analysprotokoll i Bilaga 9. Alla isotop- och haltanalyser utförda av Microseeps, Inc.

GV1					GVK17		
Förening	Tid	Halt, $\mu\text{g/l}$	Molhalt, $\mu\text{mol/l}$	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	Halt, $\mu\text{g/l}$	Molhalt, $\mu\text{mol/l}$	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
TCE (före)	Dec 2009	2000	15,2	-5,93	80	0,61	-11,9
cis-DCE (före)	Dec 2009	2000	20,6	-31,2	700	7,22	-18,1
VC (före)	Dec 2009	10	0,16	-42,9	30	0,48	-40,4
$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	Dec 2009	-20,6 ‰			$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	-18,9 ‰	
GVK6					GVK17		
TCE (efter)	Jan 2011	330	2,51	-0,11	1	0,0076	-6,46
cis-DCE (efter)	Jan 2011	3600	37,1	-22,6	4,2	0,043	-7,12
VC (efter)	Jan 2011	15	0,24	-30,9	15	0,24	-22,4
$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	Jan 2011	-21,3 ‰			$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	-19,7 ‰	
GVK6					GVK8		
TCE (efter)	Sept 2012	220	1,67	-7,18	24	0,18	-8,56
cis-DCE (efter)	Sept 2012	1600	16,5	-6,56	630	6,49	-9,20
VC (efter)	Sept 2012	2500	40,0	-17,6	520	8,32	-27,3
$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	Sept 2012	-14,2 ‰			$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	-19,2 ‰	
GV52							
TCE (efter)	Sept 2012	160	1,22	-6,98			
cis-DCE (efter)	Sept 2012	740	7,63	-13,7			
VC (efter)	Sept 2012	1300	20,8	-20,1			
$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$	Sept 2012	-17,9 ‰					



Figur 7.14 Isotobaserad massbalans. Värden från Tabell 7.17.

Tabell 7.18 Analyserade halter, µg/l, av eten i de punkter som redovisas i Tabell 7.17 (data från WSP, 2012). Röd linje visar avgränsning före respektive efter injektion.

Provpktl Datum	Dec 2009	April 2010	Jan 2011	Maj 2011	Okt 2011	Juni 2012	Sept 2012
GV1	<1	<1	2,6	31	144	456	526
GVK17	4	3	<1	<1	<1	<1	-
GVK6	9	8	24	5	72	121	59
GVK8	<1	<1	<1	<1	7,4	8,6	27
GV52	<1	<1	<1	<1	12	11	26

7.4 PLFA

I Figur 7.15 visas halt av biomassa (celler/enhet) provtaget i september 2012 från passiva provtagare i fem grundvattenrör, varav GVK3, GVK6 och GVK8 är belägna centralt i källområdet samt GVK17 och GV25 är belägna nedströms källområdet (Figur 7.12). Resultat ges i Bilaga 6. Total biomassa är beräknad utifrån innehållet av fettsyror av typen fosfolipider (PLFA). Dessa utgör en väsentlig del av mikroorganismernas cellmembraner. Vid användande av omräkningsfaktor beräknas innehållet av celler utifrån det påvisade innehållet av PLFA. Härav är biomassan givet som cellekvivalenter i förhållande till påvisad total mängd PLFA.

Som framgår av Figur 7.15 är det totala innehållet av biomassa inom intervallet ca $1 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ celler/enhet, vilket bedöms som moderat/medelinnehåll.

Den detekterade mikrobiella sammansättningen vid provtagningen i september 2012 ges i Figur 7.16. Följande bedömningar baseras på utlåtande i Bilaga 5. Proteobacteria (Monos) är den dominerande typen med ca 70 %, efterföljt av General (Nsats) med 20 %–30 %. Samtliga prover innehåller några % Firmicutes (TerBrSats) och SRB/Actinomycetes (MidBrSats), medan Eukaryoter (Polyenoics) och anaeroba metallreducerare endast har påvisats i några av proverna.

Proteobacteria (Monos) består av en bred grupp av bakterier, omfattande både aeroba och anaeroba dito. Därtill ett högt värde på General (Nsats) kan tolkas som mindre diversitet i det mikrobiella samhället. Man brukar anse att ju mindre diversitet, desto större potential för mikroorganismer som utför reductiv deklorering.

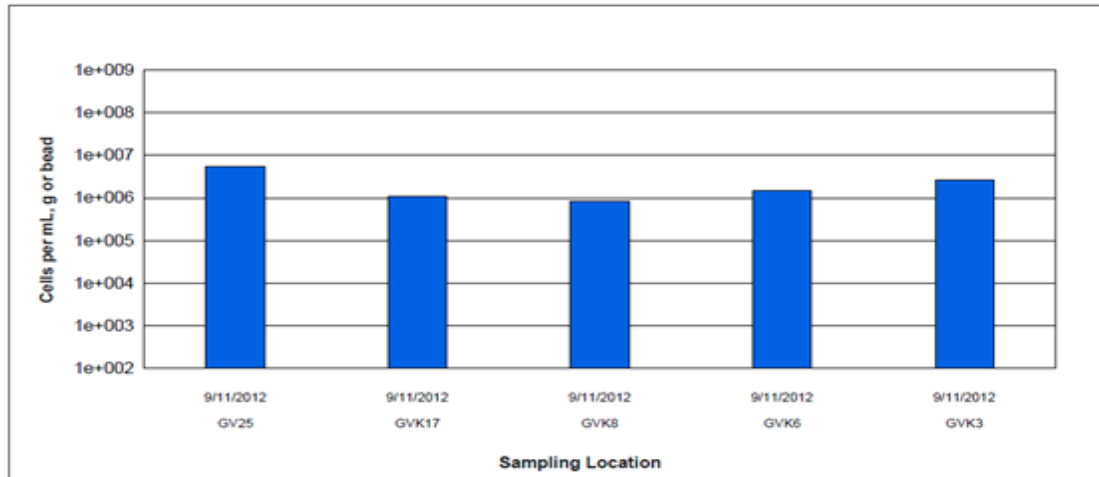
Firmicutes (TerBrSats), påvisat i alla prover, lever i syrefria miljöer. Dessa är ansvariga för fermentationen av kolkälla med bildande av det väsentliga vätet för den reductiva dekloreringen. I denna grupp finns även bakterier som kan utföra deklorering (t.ex. vissa *Dehalobacter*).

SRB/Actinomycetes är sulfatreducerare. De är påvisade i alla undersökta provpunkter. Dessa, tillsammans med de anaeroba metallreducerarna som detekterades i några prover, visar att miljön är reductiv och att det finns mikrobiell potential att bl.a. omvandla sulfat till sulfid.

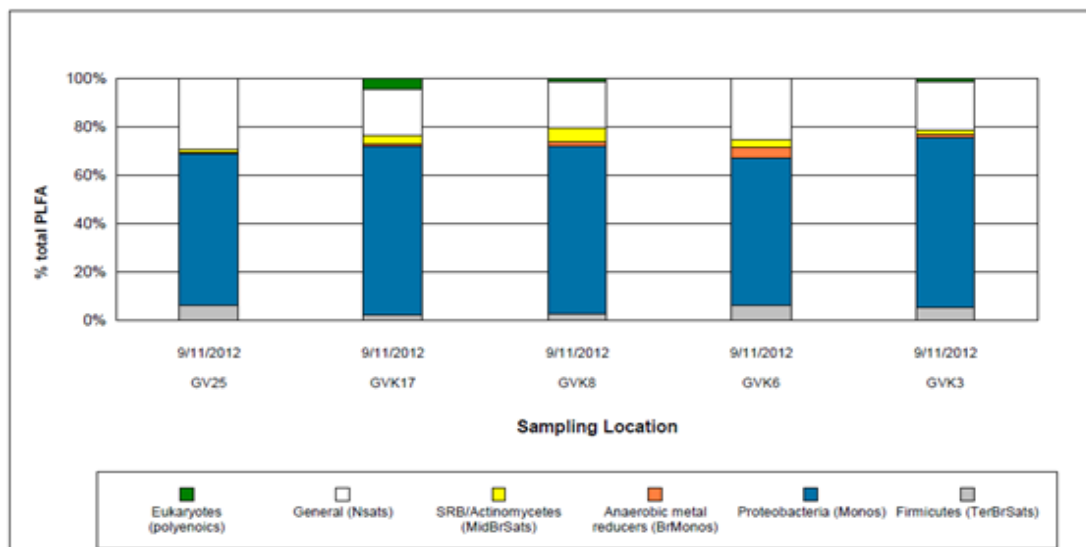
Slutligen, de Eukaryoter som är påvisade består av en bred grupp av mikroorganismer, bl.a. fungi, protozoer, alger. En ökning av dessa, speciellt vid parallell minskning av speciella mikroorganismer som bryter ned förorening, indikerar att Eukaryoterna har fått övertaget (hämmat eller tagit död på) de mikroorganismer som bryter ned föroreningen.

Tabell 7.19 sammanfattar status av total biomassa (baserat på PLFA), analyserad dels före injektion, dels vid två tillfällen efter injektionen av kolkälla (data 2010-2011 från WSP, 2012). Som framgår ses en markant ökning av biomassa 5 månader efter injektionen. Ökningen uppgår till 4-34 ggr massan före injekt-

ionen. Vid provtagningen 22 månader efter injektionen i de provpunkter som då genomgick undersökning, har biomassan markant reducerats ned till i princip massnivåer som gällde före injektionen.



Figur 7.15 Halt av biomassa, givet som cellekvivalenter baserade på total mängd fettsyror av typen fosfolipider (PLFA), extraherade från passiva provtagare i fem grundvattenrör. Total biomassa beräknad utifrån PLFA som kan kopplas till bakteriell och eukaryot biomassa. Värden från provtagning september 2012 (Bilaga 6).



Figur 7.16 Procentandelar relativt till PLFA strukturella grupper i prov från fem grundvattenrör. De mikrobiella grupperna är bestämda utifrån kemisk PLFA struktur som i sin tur är relaterade till biosyntes av fettsyror. Värden från provtagning september 2012 (Bilaga 6).

Minskning av biomassan kan hypotetiskt ha haft flera orsaker. Exempelvis kan inhibering av de deklorerande mikroorganismernas tillväxt och deras dekloreringsaktiviteter orsakas av 1/ metanogena bakterier (producerar metan) som eventuellt konkurrerar med de deklorerande mikroorganismerna att använda det väte som bildas vid fermentationen av tillsatt kolkälla, 2/ substantiell närvaro av Eukaryoter (innefattar bl.a. protozoer som kan använda de nyttiga mikroorganismerna som föda), 3/ minskad tillgång på kolkälla.

Tabell 7.19 Total biomassa (celler/enhet) bestämd med PLFA 9 månader före, 5 månader efter och knappt ca två år efter biostimulering (utförd oktober 2010).

Provpunkt	Jan 2010 (före injektion)	Mars 2011 (efter injektion)	Sept. 2012 (efter injektion)	Rel. ändring 2010-2011 & 2011-2012 (x faktor)
GV 1	e.a.	e.a.	2,37 x 10 ⁶	-
GVK 3	2,18 x 10 ⁵	4,26 x 10 ⁶	2,67 x 10 ⁶	20 & 0,6
GVK 6	5,55 x 10 ⁵	2,32 x 10 ⁶	1,49 x 10 ⁶	4 & 0,6
GVK 8	e.a.	e.a.	8,21 x 10 ⁶	- & -
GVK 17	2,93 x 10 ⁵	2,45 x 10 ⁶	1,06 x 10 ⁶	8 & 0,4
GVK 24	1,53 x 10 ⁵	1,09 x 10 ⁶	e.a.	7 & -
GVK 25	4,50 x 10 ⁵	1,66 x 10 ⁶	e.a.	4 & -
GV 22	8,17 x 10 ⁴	2,76 x 10 ⁶	e.a.	34 & -
GV 25	1,23 x 10 ⁵	3,23 x 10 ⁶	5,33 x 10 ⁶	26 & 2
GV 105	e.a.	e.a.	3,10 x 10 ⁶	- & -

Not: e.a. = Ej analyserat. - = Ej möjligt att beräkna.

I Tabell 7.20 ges procentuellt innehåll av specifika typer av mikroorganismer som detekterats i olika provpunkter före och efter injektionen (biostimuleringen). Som framgår har en tillbakagång av Firmicutes skett efter den inledande tillväxten efter injektionen. Detta är inte positivt eftersom det tyder på att de mikrobiella förutsättningarna för reaktiv deklorering avtagit. Däremot har anaeroba metallreducerare och SRB/Actinomycetes (sulfat-/järnreducerare) ökat under perioden vilket tyder på att den reaktiva miljön, främst avseende redox, upprätthållits. Innehållet av Eukaryotes är på samma procentuella nivåer över tid. Något problematiskt är alltså främst att Firmicutes minskat medan Eukaryotes ligger på en oförändrad signifikant %-nivå.

Tabell 7.20 Detekterade grupper av mikroorganismer och deras individuella procentuella fördelning samt medel-% (fet stil) och min-/max-% (inom parantes med fet stil) i sju olika provpunkter 9 månader före injektion, 5 månader efter, och 22 månader efter, injektion av kolkälla i oktober 2010.

Mikrobiellt innehåll	Jan 2010 (9 mån. före injektion) ^{1/}	Mars 2011 (5 mån. efter injektion) ^{1/}	Sept. 2012 (22 mån. efter injektion) ^{2/}
Firmicutes (TerBrSats)	0,55; 2,3; 1,4; 1,4; 3,7; 0; 0,5 1,4 (0 / 3,7)	3,0; 11,2; 5,1; 4,5; 5,1; 3,6; 3,6 5,2 (3 / 11,2)	6,5; 5,2; 6,2; 2,6; 2,0; 5,9; 4,1 4,6 (2,0 / 6,5)
Proteobacteria (Monos)	82,6; 87,3; 82,9; 79,6; 77,7; 76,6; 77,2 80,6 (77,2 / 87,3)	77,5; 66,3; 72,5; 70,1; 72,6; 66; 65,3 70,0 (66,3 / 77,5)	63,2; 70,2; 61,1; 69,3; 69,7; 62,9; 69,6 66,6 (61,1 / 70,2)
Anaerobic metal reducers (BrMonos)	0; 0,2; 0; 0; 0; 0; 0; 0 0,1 (0 / 0,2)	0,3; 0,4; 0,5; 1,9; 0,3; 0,2; 0,3 0,6 (0,2 / 1,9)	1,3; 1,2; 4,2; 1,5; 1,3; 0,5; 1,8 1,7 (0,5 / 4,2)
SRB/Actinomycetes (MidBrSats)	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0 0 (0 / 0)	0,4; 1,1; 4,5; 3,1; 4,5; 1,1; 1,5 2,3 (0,4 / 4,5)	1,8; 1,8; 3,1; 6,2; 3,4; 1,3; 1,0 2,7 (1,0 / 6,2)
General (Nsats)	15; 8,8; 14,3; 18,1; 17,2; 22; 22,3 16,8 (8,8 / 22,3)	17,2; 20,8; 17; 19; 16,8; 28,7; 29,3 21,3 (16,8 / 29,3)	26,6; 20,3; 25,3; 18,7; 19,1; 29,1; 23,3 23,2 (18,7 / 25,3)
Eukaryotes (polyenoics)	1,8; 1,4; 1,4; 1; 1,2; 2,4; 0 1,3 (0 / 2,4)	1,6; 0,3; 0,4; 1,4; 0,7; 0,5; 0,2 0,7 (0,2 / 1,6)	0,6; 0,2; 1,3; 1,6; 4,5; 0,2; 0,2 1,2 (0,2 / 4,5)

Not: 1/ För provpunkter i följande ordning: GVK3, GVK6, GVK17, GVK24, GVK25, GV22, GV25.

2/ För provpunkter i följande ordning: GV1, GVK3, GVK6, GVK8, GVK17, GV25, GV105.

7.5 Standard Bio-Trap

Tester med standard Bio-Trap har utförts dels med fristående enhet ("standard Bio-Trap"), dels med del i avancerad Bio-Trap (i dess MNA-enhet finns en del som avser att endast fokusera på mikroorganismer och deras status utan inverkan av avancerad Bio-Traps BioStim- och BioAug-delar, se Avsnitt 3.6). Gensekvensanalyser (qPCR) har utförts på dessa enheter i följande provpunkter (provpunktplacering, se Figur 7.12): GVK3, GVK6, GVK8, GVK17, GV1, GV22, GV25, GV52, GV102, GV105 och GV106. Av dessa förelåg MNA-enhet i GV1, GV52, GV 105 och GV106 (alla avancerad Bio-Trap provtagare) medan de resterande provpunkterna är provtagna med standard Bio-Trap. I båda fallen ger informationen aktuell bild av provpunktsnivåns naturliga struktur av biomassa. Resultat från 2012 i Bilaga 6 och Bilaga 8.

Enligt Bilaga 8 motsvaras "hög koncentration" av 10^5 celler/provenhet av *Dehalococcoides* spp. liksom 10^4 genkopior/provenhet av *vcrA*. Den mikrobiella populationen av både *Dehalococcoides* spp. (DHC) och *Dehalobacter* spp. i såväl källområdet som i plymen bedöms härav i de flesta provpunkter motsvara en måttlig - hög nivå avseende antal/provenhet, Tabell 7.21.

Bl.a. *Dehalobacter* liksom *Dehalococcoides* har potential att deklorera TCE till *cis*-DCE. Den aktuella biomassan i de allra flesta provpunkter bedöms härav ha en fördelaktig potential för reduktiv deklorering av befintligt TCE. Även organismer i gruppen *Desulfuromonas* spp. har potential att deklorera TCE (Griffin et al., 2004) men antalet av dessa var generellt lågt i alla prov. Därtill påvisades, i varierande antal, mikroorganismer med funktionella gener (*bvcA* och *vcrA*) kända för att ha potential att koda för produktion av enzym som reduktivt kan bryta ned VC till eten, och därmed motverka uppkoncentrering av VC. I relation här till bör man beakta att det endast utförts biostimulering och inte bioaugmentation (tillsats av mikroorganismer).

Slutsatsen är att den utförda stimuleringen av den naturligt befintliga populationen har skapat en biomassa som i de flesta punkter har god potential att utföra fullständig reduktiv deklorering av ursprungsföreningen TCE till eten. I flertal provpunkter har också visats ett över tid ökat innehåll av nedbrytningsprodukter inkl. eten, i förhållande till TCE (Avsnitt 7.1). Eftersom provpunkterna är fördelade över hela källområdet så kan det slås fast att mikrobiell potential, om än med varierade styrka, för fullständig nedbrytning finns i hela detta område.

Det bör dock noteras att de mikrobiella analyserna av gensekvenser utfördes på DNA och inte på RNA. Detta innebär att detekterade sekvenser indikerade att det förelåg potential för motsvarande nedbrytningsaktivitet men att det inte kan fastslås att de var aktiva (Avsnitt 3.4). Emellertid visade vattenanalyser av GV1 (Tabell 7.1) relativt höga halter av eten och mycket hög dekloreringsgrad. Detta tyder på aktiv nedbrytning av bl.a. VC i den punkten. Däremot synes motsatsen delvis föreligga i GV52 (Tabell 7.2), i vilken en tydlig uppkoncentrering av VC skett på senare tid.

Med ca 2 m inbördes avstånd placerades en standard Bio-Trap i GVK3 och en avancerad Bio-Trap i GV52. Enligt Tabell 7.21 detekterades markant större antal *Dehalococcoides* (DHC) i GV52, jämfört med i GVK3. Detta gäller i än högre grad de detekterade gensekvenserna *tceA* och *vcrA*. Som utgångspunkt får detta förmodas visa på den lokala variationen i akvifärens biopopulation. Huruvida skillnaden berodde på olika provenheter kan inte utvärderas utifrån enbart detta underlag men det ska redan nu noteras (diskuteras i Avsnitt 8.1.2) att det troligtvis skett läckage mellan enheterna i avancerad Bio-Trap. Det kan i så fall misstänkas ha orsakat det högre antalet gensekvenser i GV52 (dess BioAug-del var laddad med bl.a. DHC som är kända att ha dessa gensekvenser).

I plymen, ca 40 m nedströms källområdet, visar analys av den mikrobiella populationen och gensekvenser i GV102, GV105 och GV106 likaledes att det finns varierande potential för fullständig nedbrytning till eten. Utveckling av halter och dekloreringsgrader visar att i både GV102 och i GV106 är dekloreringen fortfarande begränsad, medan i GV105 pågår på senare tid tydligt ökad deklorering till eten. GV102 är placerad i randen av plymen. Det bedöms finnas, om än begränsad, potential för en indirekt påverkan där

från biostimuleringen i källområdet. Exempelvis föreligger endast lågt innehåll av DHC och lågt innehåll av *bvcA* och *vcrA*, med potential att bryta ned VC till eten. Detta underbyggs av föroreningskoncentrationerna i provpunkten, som indikerar ackumulation av VC med avsaknad av eten (Tabell 7.5).

Baserat på utfallet från standard Bio-Trap synes det sammantaget finnas betydande genetisk potential i de flesta provpunkter för fortsatt fullständig deklarerad till eten.

Tabell 7.21 Mikrobiell population, celler/provenhet, hösten 2012 i provpunkt GV102, GV105 och GV106 alla placerade i plymen, samt resterande angivna provpunkter placerade i källområdet i vilken injektion av kolkälla skedde oktober 2010. Beteckning av provpunkter i vilka MNA-enheten i avancerad Bio-Trap ersatt standard Bio-Trap är markerade med mörkröd färg, övriga från standard Bio-Trap.

Mikrobiell grupp \ Provpunkt	GVK3	GVK6	GVK8	GVK17	GV1	GV22	GV25	GV52	GV102	GV105	GV106
Dehalococcoides spp.	4,3x 10 ⁴	6,4x 10 ⁵	1,3x 10 ⁴	9,7x 10 ¹	1,9x 10 ⁵	1,8x 10 ⁴	1,4x 10 ⁴	2,0x 10 ⁶	9,3x 10 ¹	1,3x 10 ⁵	2,2x 10 ⁵
Dehalobacter spp.	3,4x 10 ⁴	1,2x 10 ⁶	1,7x 10 ⁴	3,8x 10 ⁴	1,6x 10 ⁴	1,9x 10 ⁴	3,8x 10 ⁴	1,2x 10 ⁵	4,0x 10 ³	2,0x 10 ⁵	7,7x 10 ³
Desulfuromonas spp.	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹	<5x 10 ¹
tceA reductase	4,9x 10 ²	4,7x 10 ¹	7,8x 10 ²	7,9x 10 ¹	1,4x 10 ⁵	1,6x 10 ¹	1,8x 10 ¹	1,2x 10 ⁶	3,3x 10 ¹	9,0x 10 ⁴	6,4x 10 ⁴
bvcA reductase	7,1x 10 ⁴	3,7x 10 ⁴	1,7x 10 ⁴	7,6x 10 ¹	5,2x 10 ³	6,3x 10 ¹	1,0x 10 ²	6,6x 10 ³	8,9x 10 ⁰	7,9x 10 ²	2,8x 10 ²
vcrA reductase	1,4x 10 ²	5,0x 10 ⁴	5,1x 10 ³	2,6x 10 ¹	1,6x 10 ⁴	<2,5x 10 ¹	5,4x 10 ³	6,6x 10 ⁵	7,3x 10 ²	3,8x 10 ⁴	6,1x 10 ⁴
Tot. Eubacteria	1,3x 10 ⁷	8,7x 10 ⁶	1,4x 10 ⁶	5,4x 10 ⁵	6,4x 10 ⁵	3,1x 10 ⁶	7,2x 10 ⁶	6,1x 10 ⁶	3,8x 10 ⁶	3,4x 10 ⁷	6,4x 10 ⁶
Järn-/sulfat-reducerare	8,5x 10 ³	1,1x 10 ⁵	9,1x 10 ⁵	2,5x 10 ⁴	i.a.	2,3x 10 ³	1,8x 10 ⁴	i.a.	4,7x 10 ³	i.a.	i.a.
Metanogener	5,7x 10 ⁷	9,4x 10 ⁶	8,3x 10 ⁶	1,2x 10 ⁷	i.a.	1,8x 10 ⁷	1,8x 10 ⁷	i.a.	1,1x 10 ⁷	i.a.	i.a.
pH	i.a.	i.a.	i.a.	i.a.	4,4	i.a.	i.a.	4,8	i.a.	7,2	6,8

Not. i.a. = ej analyserat.

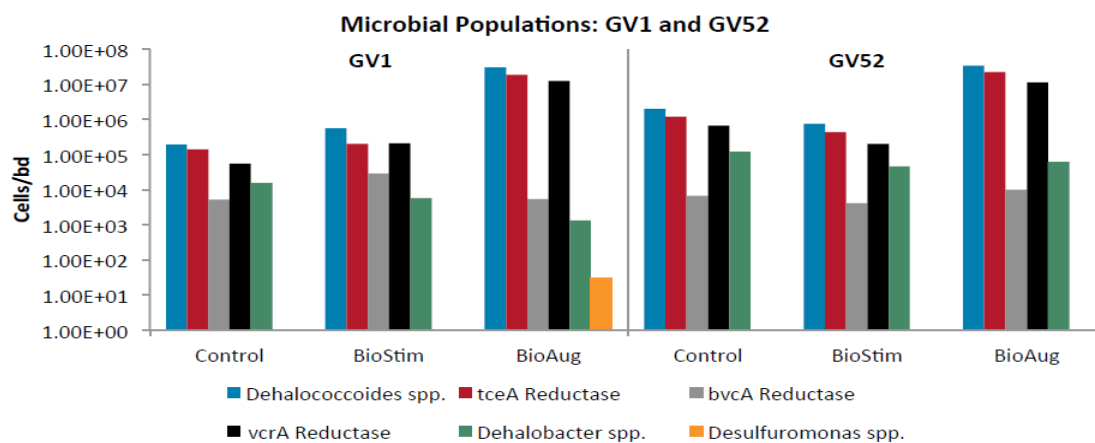
7.6 Avancerad Bio-Trap

En av anledningarna till föreliggande undersökning är att bedöma om avancerad Bio-Trap kan ge information om huruvida pågående nedbrytning av de klorerade etenerna (detekterade i kontrollenheten/MNA-enheten) kan göras mer effektiv genom tillsats av dels kolkälla (via deras BioStim-enheter), dels utvalda mikroorganismer (via deras BioAug-enheter). Alla bedömningar nedan, som är kopplade till resultat från avancerad Bio-Trap, måste tyvärr ges reservation kopplad till eventuellt läckage mellan deras inbördes olika enheter (Avsnitt 8.1.2).

Mikrobiella analyser av avancerad Bio-Trap provtagare har utförts, förutom i deras MNA-enheter (Tabell 7.21), även i deras BioStim- och BioAug-enheter. Provtagarna var placerade i GV1, GV52, GV105 och i GV106. Provpunkterna GV1 och GV52 är placerade i källområdet. Provpunkt GV105 och GV106 är placerade längs en transekt tvärs plymen ca 40 m nedströms källområdet. I Figur 7.17 visas utfallet av detekterade mikrobiella populationer och funktionella gener i provpunkt GV1 och GV52 placerade i källområdet. Alla resultat från Bilaga 8.

Parametrarna PLFA och DNA, undersökta av WSP 2010 och 2011 (dvs. dels före och dels efter injektionen av kolkälla/biostimuleringen, med standard Bio-Trap), visade att det då skedde en förbättring av den mikrobiella kulturen efter stimuleringen (från låg nivå till moderat nivå).

Jämförelse i Figur 7.17 mellan kontrollenhet (MNA-enhet) och BioStim-enhet, provtagna hösten 2012, indikerar att ytterligare tillsats av kolkälla i området kring GV1 (med 3DMe) och GV52 (med melass), inte skulle ge någon väsentlig mikrobiell förbättring (skillnaderna är marginella). Antal *Dehalococcoides* spp. (DHC) och *Dehalobacter* spp., i såväl GV1 som i GV52, är ungefär samma i kontrollenheten som i BioStim-enheten (Figur 7.17). Gensekvensen *vcrA* (som kan deklorera VC) har potential att öka betydligt med bioaugmentation medan både denna gen och genen *bvcA* (som också har potential för VC deklorering) föreligger med måttliga–höga koncentrationer oavsett om biostimulering och/eller bioaugmentation utförs eller inte. Det mikrobiella innehållet i kontrollenheterna är generellt måttligt–högt i både GV1 och GV52 för fortsatt deklorering.



Figur 7.17 Mikrobiella populationer (qPCR-resultat) och gensekvenser detekterade i avancerad Bio-Trap provtagare, placerade i grundvattenrör GV1 och GV52 (båda i källområdet). För varje provpunkt visas innehållet i kontrollenheten (MNA-enhet), BioStim-enheten och i BioAug-enheten (Bilaga 8).

Att det pågår en aktiv och fullständig nedbrytning av de klorerade föreningarna i GV1 stöds av att det är påvisat VC samt höga etenhalter i prover, både från de passiva provtagarnas kontrollenheter (Tabell 7.22) och i, de på senare tid tagna, vattenproverna (Tabell 7.1). Utfallet från BioStim-enheten indikerar att ytterligare biostimulering i GV1 inte skulle ge någon markant ökad produktion av eten (Tabell 7.22: Figur 7.18). Vidare visar den historiska utvecklingen av föroreningshalter en tydligt ökad fullständig deklorering efter biostimuleringen i oktober 2010.

BioAug-enheten i GV1 indikerar en marginell ökad produktion av eten (från en redan hög halt nivå), jämfört med de andra enheterna i samma avancerad Bio-Trap provtagare. Bioaugmentation skulle därtill öka dekloreringspotentialen via ökat innehåll av *tceA*, *vcrA* och i någon mån även *bvcA*. Med tanke på den marginella ökningen av eten, relativt signifikanta ökningen av *vcrA*, synes denna gen till betydande del ha varit inaktiv (DNA-analys).

Nedbrytning av klorerade etener pågår även i GV52 (Tabell 7.2), men den är inte lika långt gången och inte lika omfattande som i GV1. Utfallet från BioStim-enheten indikerar att ytterligare tillförsel av kolkälla till GV52 inte ger någon markant ökad produktion av eten, Tabell 7.22 och Figur 7.18. Noteras bör därtill den stora skillnaden mellan uppmätta grundvattenhalter i GV52 i oktober 2012, jämfört med i avancerad Bio-Trap från ungefär samma tid. Även om halterna i grundvattnet var betydligt lägre några månader tidigare var de även då avsevärt högre än detekterat i den passiva provtagaren. Därtill, baserat på

de över tid (sedan i början av 2011) detekterade grundvatten-halterna synes den avancerad Bio-Trap provtagaren sammantaget inte avspegla reella haltvärden av de klorerade etenerna i grundvattnet (kan vara en del-indikation på läckage, Avsnitt 8.1.2).

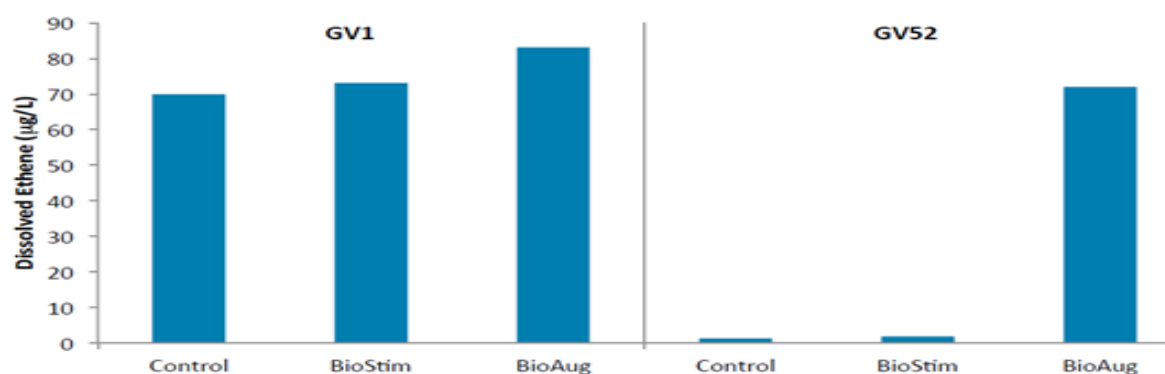
BioAug-enheten i GV52 indikerar att fullständig deklorering skulle kunna påskyndas med samtidig tillsats av mikroorganismer och kolkälla (signifikant förhöjd etenhalt, jämfört med i övriga enheter i samma provtagare).

Fettsyrainnehållet var avsevärt högre i GV52 kontrollenhet, jämfört med i GV1 kontrollenhet. Men då alla de olika fettsyrorna detekterades med ungefärligt lika stora halter i alla enheterna i GV52, kan detta eventuellt indikera läckage mellan enheter i GV52:s avancerad Bio-Trap.

Tabell 7.22 Halter av föreningar, ämne och pH påvisade i avancerad Bio-Trap i GV1 och GV52 (båda i källområdet). Nitrit och nitrat är inte medtagna i tabellen då dessa inte kunde påvisas i någon av enheterna.

Provpunkt		GV 1			GV 52		
Förening	Enhet	Kontroll (MNA)	BioStim	BioAug	Kontroll (MNA)	BioStim	BioAug
PCE	µg/l	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
TCE	µg/l	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12
cis-DCE	µg/l	< 6	< 6	< 6	< 6	BRL	< 6
VC	µg/l	3,4	4,0	< 2	18	28	110
Eten	µg/l	70	73	83	1,3	1,8	72
Etan	µg/l	< 0,2	< 0,2	0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Metan	µg/l	2460	1380	2730	2330	2150	890
Sulfat	mg/l	22	68	< 1,5	98	95	48
Klorid	mg/l	17	42	79	160	140	310
Fosfat	mg/l	1,08	40	7,8	16,8	11,8	19
Laktat	mg/l	< 1,5	2740	18	6	35	720
Acetat	mg/l	< 1,5	40	200	430	300	580
Propionat	mg/l	< 1,5	52	170	48	26	76
Butyrat	mg/l	< 1,5	50 est	18 est	540	380	460
Format	mg/l	< 1,5	< 10	< 5	28	23	< 10
pH	-	4,4	3,9	7,2	4,8	4,7	4,8

Not. est = kvalificerad uppskattning. BRL = Under rapporteringsgräns.



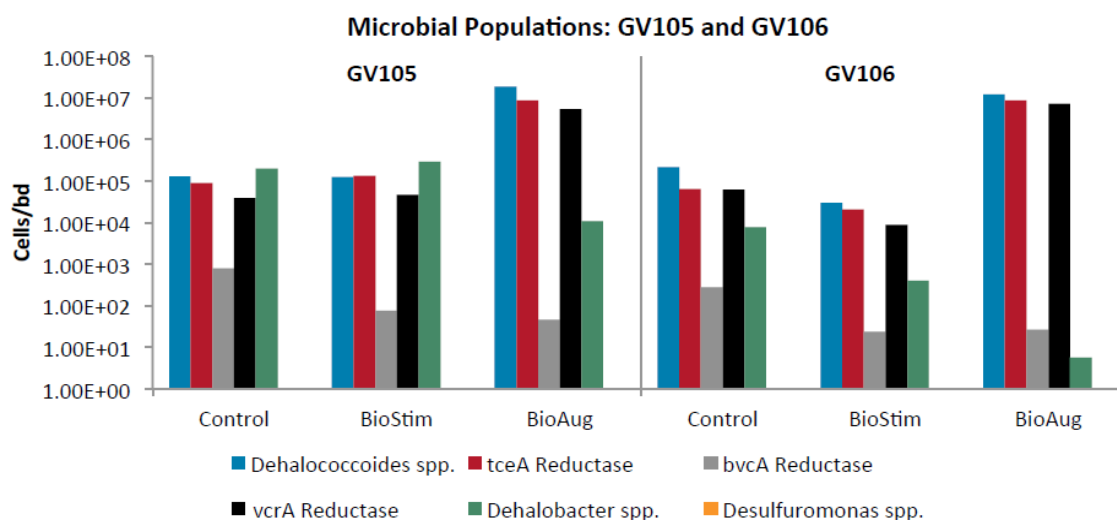
Figur 7.18 Halter av löst eten i avancerad Bio-Trap provtagare, placerade i grundvattenrör GV1 och GV52.

Det bör alltid löpande utvärderas om kolkällan i akvifären kommer att förbrukas inom alltför kort tid eller om den är tillräcklig för hela det deklorerande tidsförloppet. Analys av bl.a. fettsyror och metan kan ge indikation på om signifikant fermentation fortfarande pågår (dvs. att tillförd kolkälla inte tagit slut). Höga metanhalter kan också indikera betydande konkurrens från metanogena bakterier avseende vid fermentationen bildat väte som eventuellt kan hämma deklorering av framför allt lågklorerade etener (Wrenn, 2004). Metan bildas mikrobiellt av ättiksyra eller av koldioxid och väte (Nordberg, 2006). Metanhalterna i kontrollenheterna i GV1 och GV52 indikerade god tillgång på koldioxid och väte men inte av ättiksyra (acetathalten under detektionsgräns).

Sammantaget fås att utfallet från BioAug-enheten i GV52 indikerar, i förhållande till de övriga enheterna i den avancerad Bio-Trap provtagaren, att bioaugmentation + biostimulering i den punkten kan avsevärt påskynda dekloreringen av VC.

Det kan förväntas att det, i förhållande till den pågående reduktiva nedbrytningen, vill vara en fördel att tillföra mikroorganismer som påskyndar nedbrytningen och ger ökad dekloreringsgrad. De vill ge en mer homogen täckning av jordvolymen, och därmed ökad säkerhet att nå förorening och önskade saneringskrav "samtidigt" i hela förorenade området och inom kortare tid. Vid värdering om det i aktuellt stadium av saneringen kan ge en väsentlig fördel att utföra bioaugmentation ska det naturligtvis inkluderas t.ex. ekonomiska faktorer, krav på och tillåtelse av att använda bioaugmentation, platsspecifik riskbedömning.

I Figur 7.19 ges resultat från analys av mikrobiella populationer och valda genskvenser i de mikrobiella delarna av avancerad Bio-Trap, placerade i GV105 och GV106 i föroreningsplymen. Provtagaren i GV105 var laddad med laktat medan i GV106 var laddad med HRC (Tabell 6.1). Jämförs innehållet i kontrollenheterna (MNA-enhet) i GV105 och GV106, som avspeglar den naturliga miljön, med innehållet i BioStim-enheterna, fås ingen väsentlig skillnad. Vid värderingen ska man naturligtvis ha i tankarna att det i oktober 2010 genomfördes biostimulering med injektion av kolkälla i källområdet (40 m uppströms dessa provpunkter). Därtill, de mikrobiella analyserna av både kontroll-, BioStim- och BioAug-enheterna visar högre antal varierade och önskade mikroorganismer i BioAug-enheterna, vilket är naturligt.



Figur 7-19 Mikrobiella populationer (qPCR-resultat) och speciella genskvenser detekterade i avancerad Bio-Trap, placerade i grundvattenrör GV105 och GV106 (ca 40 m nedströms källområdet). För varje provpunkt visas innehållet i kontrollenheten (MNA-enhet), BioStim-enheten och i BioAug-enheten (Bilaga 8).

Innehållet av *Dehalococcoides* spp. (DHC) och *Dehalobacter* spp. i såväl GV105 som i GV106 är generellt måttligt–høgt (høgt endast för *Dehalococcoides* i BioAug-enheterna) och den aktuella mikrobiella kulturens funktionella gener har god potential för nedbrytning av de aktuella föroreningarna, inklusive någorlunda god potential för fullständig nedbrytning av VC till eten (signifikant förekomst av *vcrA* men lägre förekomst av *bvcA*).

I GV105 är biomassan i kontrollenheten så gott som identisk med biomassan i dess BioStim-enhet. Tillsats av laktat synes alltså inte öka biomassan.

BioStim-enheten i GV106 uppvisar generellt något lägre innehåll av biomassa än i dess kontrollenhet. Detta kan möjligtvis förklaras av det påfallande låga pH i denna enhet, markant lägre än i kontrollenheten, Tabell 7.23. Tillsats av HRC i GV106 gav alltså lägre pH och sämre resultat (under testtiden), jämfört med utan tillsats.

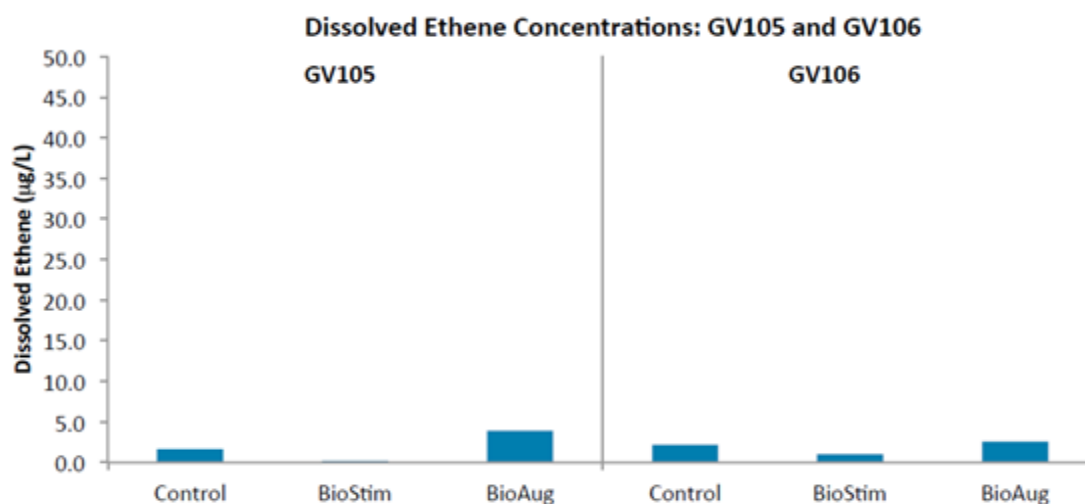
I BioAug-enheten i GV106 förelåg avsevärt högre antal *Dehalococcoides* spp. samt avsevärt mer av gensekvenserna *tceA* och *vcrA*, jämfört med i kontrollenheten. Däremot förelåg jämförelsevis avsevärt mindre av *Dehalobacter* spp. och gensekvensen *bvcA*. Möjligvis skulle orsaken till del kunna vara det påfallande låga pH också i denna BioAug-enhet (optimalt pH, se Avsnitt 2.4). Men jämförelse med utfallet i de avancerad Bio-Trap provtagarna i källområdet (Figur 7.17 och Tabell 7.22) synes inte stödja denna hypotes. Dock bedöms erhållna pH-värden i avancerad Bio-Trap vara osäkra (diskuteras nedan).

Tabell 7.23 Halter av föreningar och pH påvisade i avancerad Bio-Trap i GV105 och i GV106, båda placerade i plymen. Bl.a. nitrit och nitrat är inte medtagna i tabellen då dessa låg under detektionsnivå.

Provpunkt		GV 105			GV 106		
Förening	Enhet	Kontroll (MNA)	BioStim	BioAug	Kontroll (MNA)	BioStim	BioAug
PCE	µg/L	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
TCE	µg/L	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12
<i>cis</i> -DCE	µg/L	< 20	< 20	< 20	17 BRL	< 20	< 20
VC	µg/L	5,1	< 2	1,4 BRL	3,1	< 2	1,1 BRL
Eten	µg/L	1,6	0,2	3,9	2,2	1,0	2,6
Etan	µg/L	< 0,2	< 0,2	0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Metan	µg/L	280	1,1	260	200	37	33
Sulfat	mg/L	86	250	205	< 1,5	82	91
Klorid	mg/L	180	260	270	89	93	120
Fosfat	mg/L	0,88	6015	31,6	1406	23	7705
Laktat	mg/L	< 5	< 10	3890	< 5	3760	4610
Acetat	mg/L	160	170	1300	130	6 BRL	15
Propionat	mg/L	250	400	2160	140	92	210
Butyrat	mg/L	< 5	< 10	50 est	< 5	70 est	130 est
Format	mg/L	< 5	< 10	< 20	< 5	< 10	< 10
pH	-	7,2	7,1	7,2	6,8	3,6	3,9

Not: est = kvalificerad uppskattning. BRL = Below Reporting Level.

Figur 7.20 visar diagrammässigt utfallet av etenproduktionen i GV105 och GV106. Det framgår att varken BioStim- eller BioAug-enheterna genererar någon signifikant ökad nedbrytning av VC till eten. Ökningen av förekomst av *vcrA* synes alltså indikera att potential finns men att denna genskvens inte är påslagen (generna analyserade på DNA).



Figur 7.20 Halter av löst eten i avancerad Bio-Trap provtagare, placerade i grundvattenrör GV105 och GV106.

Av Tabell 7.23 framgår vidare att kontrollenheterna i både GV105 och GV106 påvisade mer av metan än i motsvarande BioStim-enheter. Eventuell vätekonkurrerande metanproduktion (metanproduktion kan eventuellt konkurrera om vätet med dekloreringen) synes alltså vara lägre i BioStim-enheterna. Tillsats av kolkälla skulle härav, något oväntat, kunna minska metanproduktionen med fördel för dekloreringen av bl.a. VC (eventuellt även indikerat av något lägre VC halt i BioStim).

BioAug-enheten i GV105 synes inte ha minskat metanproduktion, i motsats till motsvarande enhet i GV106, medan etenproduktionen (indikation på VC-reduktion), relativt sett, var högst i båda BioAug-enheterna.

Koncentrationerna av kloreter i kontrollenheterna i avancerad Bio-Trap i GV105 och GV106 var redan i utgångsläget låga. Då dessa var låga är det vanskligt att utifrån resultaten bedöma huruvida bioaugmentation skulle kunna vara en fördel i detta delområde vid denna tidpunkt av sanerings-förloppet. De låga överensstämmer dock inte med innehåll i vattenprover från samma provpunkt. Vid jämförelse av Tabell 7.23 med Tabell 7.6 och Tabell 7.7 fås att framför allt *cis*-DCE, och i någon mån även VC och etenhalterna, var betydligt högre i vattenproverna tagna under sommar-höst 2012 (period inom vilken de avancerad Bio-Trap provtagarna var utplacerade i grundvattnen). Orsaken till de låga halterna i de avancerad Bio-Trap provtagarnas kontrollenheter, jämfört med i vattnet, är okänd.

Slutligen bör noteras den betydande variation i pH som erhållits i de olika delenheterna i alla fyra avancerad Bio-Trap provtagarna (Tabell 7.22 och Tabell 7.23). I t.ex. GV1 och GV52 erhöles i kontrollenheten (MNA-enheten) avsevärt lägre pH än vad som anses krävs för fullständig deklorering (Avsnitt 3.4). Ändå synes fullständig deklorering ske, om än i varierande utsträckning (t.ex. 98 % DKG i GV1; Tabell 7.1). Vidare var pH neutralt BioAug-delen i GV1 men inte i dess övriga delenheter. I GV105 var pH oförändrat neutralt mellan de olika delenheterna medan i GV106 endast i MNA-enheten. Någon koppling mellan höga och låga fettsyrahalter och pH synes heller inte föreligga. Kontrollmätningar av grundvattnets pH i GV1, GV52 och GV106, utförda av WSP efter föreliggande projekts avslut, visade på pH-värden mellan pH 6,5–pH 6,8. pH-värdena i alla delenheterna i de avancerad Bio-Trap-provtagarna bedöms härav som

osäkra. pH-resultaten bedöms preliminärt indikera att det skett läckage mellan olika delenheter i avancerad Bio-Trap (läckaget diskuteras i Avsnitt 8.1.2) eller att pH-mätning med kontrollenheterna av andra orsaker gett osäkra värden.

Utfallet från de två avancerad Bio-Trap provtagarna i plymen synes för flertalet parametrar ge osäkert underlag för att bedöma behov av bioaugmentation eller ytterligare biostimulering. Resultaten från Bio-Aug-enheter indikerar dock att ökad potential för deklorering skulle kunna åstadkommas med tillsats av mikroorganismer. Detta ska i så fall, liksom för området vid GV1 och GV52, ingå i en samlad överordnad utvärdering. Inte minst bör då följas upp huruvida den tydliga ökningen av dekloreringsgraden som skett under hösten 2012 i GV105 (Tabell 7.10) är tillfällig eller om ny trend av markant ökad deklorering inletts. Om det senare är fallet synes behov av bioaugmentation inte föreligga i dess närområde. Hänsyn bör även tas till eventuell tillförsel/transport av kolkälla, nedbrytningsprodukter (VC och eten) och mikroorganismer till GV105 och GV106, från det uppströms liggande källområdet.

7.7 Sammantaget utfall

Varierande omfattning av information föreligger från provpunkter i källområdet, strax nedströms källområdet, samt i plymen. Informationen, som getts mer ingående i ovanstående avsnitt, sammanfattas kortfattat nedan. Kompletterade uppgifter har inhämtats från WSP (2012). Alla specificerade provpunkter är listade i ordningsföljd avseende placering i grundvattnets riktning.

Inledningsvis ges kortfattad sammanfattande information för källområdet, baserat på resultat från provpunkterna GVK25, GVK24, GV52, GVK3, GV1, GVK8 och GVK6.

GVK25

- Tydlig ökad dekloreringsgrad, DKG (21 % i december 2009 till > 69 % i oktober 2012).
- Efter injektion detekterbara halter av VC och eten samt markant minskning av TCE. VC har på senare tid minskat efter en temporär ökning direkt efter injektion. Både *cis*-DCE och VC förelåg hösten 2012 i klart detekterbara halter och etenhalten var relativt hög.
- Måttligt höga halter av *Dehalococcoides* spp. och *Dehalobacter* spp. Måttligt hög halt av *vcrA* men lågt innehåll av *tceA* och *bvcA*.
- Inga halter idag över åtgärdskraven.

Kommentar: Begränsat underlag men data verifierar fullständig nedbrytning. Den totala nedbrytningen är måttligt långt gånge. Mikrobiell potential synes föreligga för fortsatt nedbrytning av främst VC.

GVK24

- Låg dekloreringsgrad (24 %–31%) samt ingen signifikant förändring sedan december 2009.
- Genomgående signifikanta halter TCE och *cis*-DCE men inget detekterbart VC, ej heller eten.
- Ingen provtagning hösten 2012 men vid provomgång hösten 2011 förelåg både TCE och *cis*-DCE över åtgärdskraven.

Kommentar: Aktuell information saknas. Nedbrytningen fram till hösten 2011 var avstannad och inga tecken förelåg avseende någon fullständig nedbrytning. Orsaken är okänd och bör undersökas. Data avseende mikrobiell status föreligger inte. Behov av bioaugmentation och/eller biostimulering bör övervägas om situationen efter 2011 inte nämnvärt ändrats.

GV52

- Både BioStim- och BioAug-enheterna var vid starten laddade med melass.
- $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -17,9 \text{ ‰}$ hösten 2012. Tydlig signal avseende fullständig nedbrytning till eten.
- Högt antal *Dehalococcoides* spp. och måttligt-högt antal *Dehalobacter* spp. hösten 2012, men ingen signifikant ökning av dessa om kolkälla skulle tillsättas. Högt innehåll av *tceA*, högt innehåll av *bvcA* och lågt innehåll av *vcrA*. *Dehalococcoides* spp. kan sannolikt nå ännu högre halter, liksom *vcrA* och *tceA*, med bioaugmentation.
- Höga halter av TCE, *cis*-DCE och VC, måttliga halter av eten (47; 930; 60 resp. 12 µg/l) hösten 2011 varav alla ökade ytterligare hösten 2012. Alla klorerade etener markant över åtgärdskraven.
- Dekloreringsgrad ökat, från 29 % före injektion till 52 % hösten 2012.
- Låga-mycket låga halter av TCE och *cis*-DCE i MNA-, BioStim- och BioAug-enhet, måttliga halter av VC i MNA- och BioStim-enhet, hög halt av VC i BioAug-enhet, låga halter av eten i MNA- och BioStim- enhet men hög halt eten i BioAug-enhet.

Kommentar: Fullständig nedbrytning pågår men synes vara måttlig. Höga halter klorerade etener föreligger hösten 2012. Molandelen VC har ökat med tiden. Stor ökning av totala molhalten (summa av alla klorerade etener) vid senaste provomgång. Fördelning mellan TCE och nedbrytningsprodukter under den senaste provomgången kan hypotetiskt indikera tillfällig tillförsel av klorerade etener uppströms ifrån och/eller ökad biologisk aktivitet (t.ex. metanproduktion) som i så fall orsakat ökad utlakning av föreningarna från den fasta matrisen. Bioaugmentation synes ha potential att påskynda förloppet i denna punkt. Negativt för utvärdering med testad avancerad Bio-Trap är främst att MNA-enheten, liksom BioStim- och BioAug-enheterna uppvisade halter av TCE och *cis*-DCE under deras detektionsgränser (fastän halterna från vattenprovtagningen uppvisade avsevärt högre halter). Detta gör utvärdering av resultat från avancerad Bio-Trap i denna punkt osäker. Dock kan den markant ökade halten eten i BioAug-enheten eventuellt indikera fördel med att tillsätta en kombination av bakterier och kolkälla. Den signifikant ökade totala molhalten av klorerade etener i september 2012 bör följas upp med brett analysprogram för att klargöra orsak samt möjligheter att påskynda fullständig nedbrytning.

GVK3

- Stor ökning av biomassa direkt efter injektion varefter liten minskning fram till hösten 2012.
- Ursprunglig signifikant halt av TCE har idag brutits ned. Halterna av *cis*-DCE synes på senare tid minska medan VC-halten på senare tid har ökat och ligger idag över åtgärdskraven. Eten har aldrig detekterats över detektionsgräns.
- Dekloreringsgrad har ökat, från 26 % för injektion till 52 % hösten 2012.
- Måttligt antal *Dehalococcoides* spp. och måttligt–högt antal *Dehalobacter* spp. hösten 2012, samtidigt som *tceA*- och *vcrA*-nivåerna var låga (*bvcA*-nivån var måttlig).

Kommentar: Inga indikationer på fullständig nedbrytning. Låga–måttliga *tceA*-, *vcrA*- och *bvcA*-halter kan eventuellt tyda på låg–måttlig nedbrytningshastighet, vilket styrks av den aktuella måttliga dekloreringsgraden samt ökad VC halt och inget detekterbart eten. Den stora ökningen av biomassa beror sannolikt delvis på tillväxt av metanogener, som detekterats i högt antal under hösten 2012 (Tabell 6.21). Oklart hur omfattande deras metanproduktion är (kan eventuellt indirekt indikeras av signifikant DOC halt). Metanproduktion har potential (genom konkurrens om vätet) att delvis hämma deklorering av lågklorerade etener. Eventuellt skulle framtida förmodade ökning av dekloreringsgrad, med fokus främst på VC, kunna påskyndas med bioaugmentation (men inte med biostimulering om betydande metanproduktion sker).

GV1

- Mycket stor ökning i dekloreringsgrad (20 % i december 2009 till > 98 % i oktober 2012).
- Mycket stor haltminskning av TCE och *cis*-DCE och stor produktion av VC och mycket stor produktion av eten efter injektion fram till höst 2012 (vid senaste provomgång var halterna 2,2, 370, 570 resp. 144 µg/l).
- BioStim- och BioAug-enheterna var vid starten laddade med 3DMe.
- Låga-mycket låga halter av TCE, *cis*-DCE och VC, samt höga halter av eten, i MNA-, BioStim- och BioAug-enhet. Markant ökning av organiska syror i BioStim- och BioAug-enhet.
- $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -20,6 \text{ ‰}$ i december 2009 (före injektion).
- Högt antal *Dehalococcoides* spp. och måttligt–högt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012 men ingen signifikant ökning av dessa om kolkälla skulle tillsättas. Innehållet av *tceA* var då måttligt–högt medan *bvcA* och *vcrA* var måttligt–lågt. *Dehalococcoides* spp. har potential att öka markant, liksom *vcrA* och *tceA* med bioaugmentation. Dock, baserat på analys av avancerad Bio-Trap skulle ökning i nedbrytning i sådant fall bli marginell.
- VC-halten hösten 2012 måttligt över åtgärdskraven.

Kommentar: Omfattande och fullständig nedbrytning har pågått och i viss mån pågår. Mycket omfattande reduktion av TCE direkt efter injektion, följt av temporär uppgång i *cis*-DCE halten som nu avklingat, följt av uppgång i VC-halten som nu avklingat. Konstant ökning av etenhalt över tid. Tillsammans med övriga data ger dess värde på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -20,6 \text{ ‰}$ att lämpligt bakgrundvärde för denna parameter bör vara signifikant lägre än -21 ‰. Detta gör i sin tur sammantaget att i alla de punkter som under åren uppvisat kompletta isotopvärden (så att $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ kan beräknas) har det pågått, eller pågår, fullständig nedbrytning.

Negativt är bl.a. att MNA-enheten i avancerad Bio-Trap uppvisade halter av TCE och *cis*-DCE under deras detektionsgräns (12 resp. 6 µg/l) samt låg VC halt (3,4 µg/l). Liknande tendens i BioStim- och BioAug-enheterna. Detta gör utfallet från avancerad Bio-Trap svårtolkat. Behov av bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering synes dock inte föreligga i dagsläget.

GVK8

- $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -19,2 \text{ ‰}$ hösten 2012.
- Tydlig reduktion av TCE- och *cis*-DCE-halterna över tid, medan VC- och eten-halterna ökar. Hösten 2012 var halterna av *cis*-DCE och VC över åtgärdskraven.
- Måttligt antal *Dehalococcoides* spp. och måttligt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012. Måttligt-högt innehåll av *bvcA*- och *vcrA*-gener.
- Dekloreringsgrad ökat, från 24 % före injektion till 56 % hösten 2012.

Kommentar: Isotopkvoter, liksom detekterat eten, ger att fullständig deklorering pågår. Detta stöds även av de potentiellt goda mikrobiella förutsättningarna för nedbrytning.

GVK6

- Måttlig ökning i dekloreringsgrad (18–40%).
- TCE-, *cis*-DCE- samt VC-halterna under hösten 2012 avsevärt över åtgärdskraven.
- Moderat haltminskning av TCE, moderat ökning av *cis*-DCE markant ökning av VC samt på senare tid markant ökning av eten, sedan december 2009.
- $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -21,6 \text{ ‰}$ i januari 2011 (efter injektion) och $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -14,2 \text{ ‰}$ i september 2012, dvs. markant ökning som indikerar ökad omfattning av fullständig nedbrytning till eten.
- Måttlig ökning av biomassa direkt efter injektion varefter liten minskning fram till hösten 2012.
- Högt antal *Dehalococcoides* spp. och högt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012. Mycket lågt innehåll av *tceA*, måttligt innehåll av *bvcA* och *vcrA*.

Kommentar: Fullständig nedbrytning pågår men i långsam takt. Det aktuella mikrobiella fokuset ligger idag främst på TCE och *cis*-DCE. Eventuellt erhåller denna punkt visst inflöde av klorerade etener från närliggande uppströms område. P.g.a. de generellt höga halterna kommer det att ta tid att nå åtgärdskraven. Punktens historia och status indikerar stort behov av påskyndad fullständig nedbrytning och förutsättningarna bör kunna optimeras (bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering).

I det följande ges kortfattad sammantagen information för område strax nedströms källområdet, baserat på resultat från provpunkterna GV25, GVK17 och GV22.

GV25

- Mycket stor ökning i dekloreringsgrad (30 % i december 2009 till > 94 % i oktober 2012).
- Måttliga halter TCE och *cis*-DCE före injektion som blivit kontinuerligt lägre halter efter injektion. Markant ökning av eten efter injektion och temporär uppgång av VC med efterföljande nedgång. VC-halt hösten 2012 något över åtgärdskraven.
- Stor ökning av biomassa direkt efter injektion varefter mindre ökning fram till hösten 2012.
- Måttligt antal *Dehalococcoides* spp. hösten 2012 och måttligt-högt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012. Innehåll av *tceA* och *bvcA* lågt medan *vcrA* måttligt.

Kommentar: Fullständig nedbrytning pågår. Mycket hög dekloreringsgrad har hittills uppnåtts. Mikrobiella situationen och status av *bvcA* och *vcrA* kan ev. göra att det dröjer något innan åtgärdskravet för även VC nås. Detta eventuellt även indikerat av ökningen av biomassa som till del hypotetiskt kan vara orsakat av tillväxt av metanogena bakterier (kan undersökas med metanalyt av vatten). Dessa kan eventuellt konkurrera om vätet med de bakterier som deklorerar etenerna. Om halten VC varit signifikant högre skulle eventuellt bioaugmentation (men inte biostimulering) kunna övervägas för att försöka påskynda dekloreringen av VC.

GVK17

- $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -18,9 \text{ ‰}$ i december 2009 (före injektion) och $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} = -19,7 \text{ ‰}$ i januari 2011 (efter injektion)
- Dekloreringsgraden oförändrat måttligt hög (63 %–65 %) sedan några månader före biostimuleringen.
- Ökning av biomassa direkt efter injektion varefter minskning fram till hösten 2012.
- Mycket lågt antal *Dehalococcoides* spp. och måttligt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012. Mycket lågt innehåll av *tceA*, *bvcA* och *vcrA*.
- Mycket låga halter av TCE, *cis*-DCE och VC. Sommaren 2012 låg alla halter av klorerade etener under åtgärdskraven (WSP 2012).

Kommentar: Fullständig nedbrytning pågår och halterna är låga (under åtgärdskraven). Nedbrytning av kvarvarande VC till eten är sannolikt hämmad av att det inte föreligger mikroorganismer med genupsättningar som har potential att deklorera VC. Detta kan bero på att halten VC är låg.

GV22

- Stor ökning av biomassa direkt efter injektion.
- Måttligt antal *Dehalococcoides* spp. och måttligt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012.
- Data från WSP (2012) visar idag låga TCE-halter, från att ha varit avsevärt högre före och strax efter injektionen i oktober 2010. En tidigare temporär uppgång av *cis*-DCE har nu gått ned medan VC- och eten-halterna gick markant upp vid provtagning i maj 2011, varefter även VC-halten stadigt minskat fram till juni 2012 till strax över åtgärdskraven.
- Ökningen av dekloreringsgrad (DKG) var marginell ca fyra månader efter injektion men tog fart efter ytterligare ca 4 månader. DKG ökade från 22 % i december 2009 till 63 % i oktober 2011. Enligt WSP (2012) var DKG ännu högre (77 %) åtta månader senare.

Kommentar: Fullständig nedbrytning pågår och dekloreringen förväntas att inom några månader generera halter av alla klorerade etener under åtgärdskraven.

I det följande ges kortfattad sammantagen information för plymorråde, ca 40 m nedströms källområdet, baserat på resultat från provpunkterna GV102, GV105 och GV106.

GV102

- Låg dekloreringsgrad (34 %–38 %) samt ingen signifikant förändring sedan december 2009.
- Låga halter TCE, men vid senaste två provomgångar ökade halterna av *cis*-DCE och VC, resulterande i att dessa nu ligger strax över nivå för åtgärdskraven. Eten under detektionsgräns vid de två senaste provtillfällena.
- Mycket lågt antal av *Dehalococcoides* spp. och lågt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012.

Kommentar: Låg hastighet på dekloreringen och inga tecken på fullständig nedbrytning. Förutsättningarna synes vara otillfredsställande för nedbrytning av VC. Förutom lämpliga mikroorganismer (för nedbrytning av lågklorerade etener) saknas troligtvis fermenterbar kolkälla. Om halterna av *cis*-DCE och VC inte minskar bör biostimulering och bioaugmentation övervägas för att påskynda fullständig deklorering.

GV105

- Måttligt ökad dekloreringsgrad (30 % före injektion till > 66 % i oktober 2012).
- Vid senaste provomgång hösten 2012 förelåg både TCE, *cis*-DCE och VC över åtgärdskraven. Minskning av TCE har dock skett men VC halten har markant ökat vid senaste provomgång. Eten över detektionsgräns vid senaste provomgång.
- Både BioStim- och BioAug-enheterna var vid starten laddade med laktat.

- Måttligt–högt antal av *Dehalococcoides* spp. och måttligt–högt antal *Dehalobacter* sp. hösten 2012 men ingen signifikant ökning av dessa om kolkälla skulle tillsättas. Däremot skulle *Dehalococcoides* spp. öka markant, liksom *vcrA* och *tceA*, med bioaugmentation.
- Halter av TCE och *cis*-DCE under detektionsgräns i MNA-, BioStim- och BioAug-enhet. Detektionsgränserna var dock relativt höga (12 µg/l–20 µg/l) men betydligt högre halter detekterade i vattenprov i juni-oktober 2012 (WSP, 2012). Högst VC-halt (5,1 µg/l) detekterad i MNA-enheten. Eten detekterat med halter signifikant över dess detektionsgräns i både MNA- och BioAug-enhet (1,6 µg/l resp. 3,9 µg/l). Markant ökning av organiska syror i BioAug-enhet.

Kommentar: Fullständig nedbrytning pågår men synes vara begränsad genom koncentrerad av VC. Avancerad Bio-Trap gav ingen indikation på om förloppet skulle kunna dra nytta av biostimulering och/eller bioaugmentation, eftersom halterna i det passiva provtagningssystemet i de allra flesta fall låg under detektionsgräns, oavsett enhet.

GV106

- Marginellt ökad dekloreringsgrad (33 % före injektion till > 42 % i oktober 2012).
- Vid senaste provomgång juni 2012 förelåg *cis*-DCE fortfarande över åtgärdskravet. *cis*-DCE halten har hållit sig relativt oförändrad över tid. VC ökade temporärt i oktober 2011 för att därefter återgå till låga halter. Eten detekterades för första gången i juni 2012.
- Både BioStim- och BioAug-enheterna var vid starten laddade med HRC.
- Måttligt–högt antal av *Dehalococcoides* spp. och måttligt–lågt antal *Dehalobacter* spp. hösten 2012 men ingen signifikant ökning av dessa om kolkälla skulle tillsättas. Däremot skulle *Dehalococcoides* spp. öka markant, liksom *vcrA* och *tceA*, med bioaugmentation.
- Detekterade halter vid senaste provomgångarna samt minskning av dekloreringsgrad kan eventuellt tyda på att de lågklorerade etenerna till (liten) del har oxiderats.
- Halter av TCE och *cis*-DCE under detektionsgräns (eller lägsta rapporteringsnivå) i MNA-, BioStim- och BioAug-enhet. Detektionsgränserna var dock relativt höga (12 µg/l–20 µg/l). Betydligt högre halter av *cis*-DCE i vattenprov mellan april 2010 - juni 2012. VC-halterna generellt låga men högst i MNA-enheten (3,1 µg/l). Låga halter av eten i MNA-, BioStim- och BioAug-enhet (2,2 µg/l, 1,0 µg/l resp. 2,6 µg/l). Markant ökning av vissa organiska syror i BioStim- och BioAug-enhet.

Kommentar: Indikation (dock liten) på fullständig deklorerad i vattenprov från juni 2012 (eten 5 µg/l). Avancerad Bio-Trap gav ingen indikation på om förloppet skulle kunna dra nytta av biostimulering och/eller bioaugmentation, eftersom halterna i det passiva provtagningssystemet i de allra flesta fall låg under detektionsgräns, oavsett enhet. Noteras bör det i övrigt likartade utfallet med GV105.

8 Diskussion

I detta kapitel diskuteras erfarenheter som erhållits i projektet. Diskussionerna har delats in i avsnitt med följande rubriker:

- Erfarenheter med avancerad Bio-Trap
- Erfarenheter med qPCR
- Erfarenheter med PLFA
- Erfarenheter med isotopundersökningar
- Osäkerhet i dekloreringsgrad för klorerade etener
- Preliminär bedömning av nedbrytningsstadium i källa och plym
- Behov av bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering?

Därefter ges information om kostnader för analys av standard, och avancerad, Bio-Trap samt CSIA.

8.1 Erfarenheter med avancerad Bio-Trap

Användandet av avancerad Bio-Trap har som målsättning att svara på frågor huruvida tillsats av kolkälla och/eller tillsats av mikroorganismer är till fördel i en akvifär förorenad med t.ex. klorerade etener. Som alternativ till att använda sig av avancerad Bio-Trap finns främst fältmässiga pilottester med verkliga injektioner (biostimulering och/eller bioaugmentation). Eventuellt kan tester på anaeroba jordkärnor och grundvatten i laboriemiljö vara ett delalternativ men laborietester kan sällan fullt ut avspegla de reella förhållandena i fält. Jämfört med avancerad Bio-Trap är pilottest avsevärt mer kostnads- och tidskrävande och dessutom tekniskt mer utmanande. Även jämförbara labtester är vanligtvis dyrare än tester med avancerad Bio-Trap.

Som utgångspunkt är själva hanteringen av Bio-Trap enkel men utplacering, upptag och paketering samt val av relevant transportmedel bör utföras av erfaren tekniker som känner till bakgrunden med metoden, platsen/rören/nivåer de ska placeras i samt kännedom om provmaterialet och tider som de ska sitta i grundvattenrören så att det uppnås god kvalitet av proven för vidare analyser. Vid utvärdering av resultaten från avancerad Bio-Trap ska främst utfallet från dess olika delenheter jämföras, och i mindre grad utfallet mellan olika avancerad Bio-Trap. Det bör beaktas vid utvärdering att avancerad Bio-Trap, i den utformning som här testats, var totalt drygt 1 m lång. Detta gäller inte minst i kloretenförorenade akvifärer, där föroreningssituation kan variera avsevärt inom sådan vertikal sträcka.

En nackdel med både standard, och avancerad, Bio-Trap är att både själva provtagarna och analyser av dessa inte är kommersiellt tillgängliga hos svenska företag. Det medför en osäkerhet kring resultaten beroende på transporttid och logistik.

8.1.1 Avancerad Bio-Trap eller aktivt pilottest?

Med användning av avancerad Bio-Trap i ett område förorenat med klorerade lösningsmedel i jord/grundvatten är avsikten att kunna värdera dels naturlig mikrobiell bakgrundnivå, dels effekten av eventuell biostimulering och/eller bioaugmentation. Samtidigt analyseras nivån av konkurrerande mikroorganismer, nivå av anjoner (som också ska reduceras, i konkurrens med de klorerade föroreningarna), fördelning av föroreningarnas koncentrationer, relevanta gaser (eten, etan, metan) och fettsyror som bildas vid fermentation av olika tänkbara kolkällor.

En första inledande fråga är om den passiva provtagning som nu utförts med avancerad Bio-Trap utvärderingsmässigt kan ersätta ett aktivt pilottest i fält med verkliga injektioner. Man kan inte förutsätta att man kan få alla svar med avancerad Bio-Trap som sitter i grundvattnet upp till 90 dagar. Avancerad Bio-Trap har dock potential att ge viktiga indikationer och metoden kräver i princip endast utplacering, upptag och analys av provtagaren. Metoden bedöms i normalfallet som betydligt mindre kostnadskrävande än i det aktiva fallet, även om kostnaden per enhet samt analys av varje komplett avancerad Bio-Trap-enhet i föreliggande fall 2012 är signifikant (Avsnitt 8.8). Det kan noteras att för att uppnå motsvarande säkerhet i bedömningen av eventuellt ökad mikrobiell nedbrytning genom biostimulering och/eller bioaugmentation, så är det i princip samma analysunderlag som behöver tas fram, vare sig det är ett aktivt pilottest eller användande av passiv provtagare. En kanske viktigare fråga är om det passiva fallet ger ett underlag som är minst lika tillförlitligt som ett aktivt pilottest.

Information från ett aktivt pilottest ger teknisk information som är viktig för design av ett fullskaletest (t.ex. hydrauliska effekter på fördelningen av kolkälla i fält och matrisens förmåga att upprätthålla goda förutsättningar för deklorering). Det kan slås fast att sådan information inte kan erhållas med enbart passiva provtagare. Emellertid kan avancerad Bio-Trap ha en nisch innan eventuellt pilottest för att avgöra huruvida det är effektivt att sätta igång ett pilottest eller inte. Vidare kan avancerad Bio-Trap användas på samma sätt som i föreliggande projekt, dvs. i ett område med pågående sanering kan provtagarna användas för att bedöma om upprepade omgångar med stimulering eller om bioaugmentation kan effektivisera förloppet.

Inför pilottest (eller inför fullskaleutförandet om pilottest inte bedöms behövas) bör avancerad Bio-Trap även kunna ge viss information om lämplig design av själva pilottestet som sådant. Exempelvis är det viktigt att veta vilken eller vilka kolkällor som ger bäst platsspecifik effekt och/eller om nedbrytningen kan påskyndas med injektion av ett optimalt urval av mikroorganismer. Dessa okända variabler undersöks inte sällan med kostnadskrävande laboratorietester. Här kan principen med avancerad Bio-Trap ha förutsättningar att konkurrera. Men om de är laddade med olika kolkällor måste man vid jämförandet beakta att de har olika fermentationshastigheter som påverkar produktion och halt av t.ex. nödvändigt väte och metan (som kan vara konkurrerande till dekloreringen) under de maximalt 90 dygn som de ska sitta ute i grundvattnet.

Baserat på ovan så kan man hävda att avancerad Bio-Trap ändå har viss potential att ersätta verkliga pilotförsök. Men pilotförsök ger viktig unik information om bl.a. förhållandena på platsen och praktiska upplysningar som kan vara avgörande för lyckad sanering. Därtill, innan användandet av avancerad Bio-Trap krävs att orsaker till de osäkerheter som i föreliggande fall uppkommit med avancerad Bio-Trap har klarlagts och lösts (se nästa avsnitt).

Slutsatsen i detta projekt är därför att avancerad Bio-Trap, förutsatt att de nu erfarna problemen lösts, inte fullt ut kan ersätta ett pilottest i fält. Avancerad Bio-Trap bedöms dock principiellt kunna ge ett gott komplement till försök med verkliga injektioner, exempelvis för att få en bättre täckning av förhållandena på platsen eller för att följa utvecklingen i testområdet. Den passiva metoden kan vidare användas för att bedöma möjliga effekter av ytterligare stimuleringssteg eller tillsättning av bakterier.

8.1.2 Osäkerhet med avancerad Bio-Trap

Föreliggande projekt hade som utgångspunkt att biostimulering redan utförts. Avancerad Bio-Trap testades för att undersöka om det fanns potential, eller behov av, att ytterligare biostimulera hela eller delar av området samt om det skulle kunna vara fördelaktigt att genomföra en bioaugmentation i hela eller delar av området. Tanken var även att försöka identifiera förhållanden som hämmar eller kan hämma den reaktiva dekloreringsprocessen.

En viktig erfarenhet från projektet är att de testade avancerad Bio-Trap genererade osäkerheter i resultaten. Dessa osäkerheter orsakades troligtvis av vertikal påverkan/läckage mellan de tre enheterna (kontrol-

lenhet/MNA, BioStim och BioAug), fastän de var utrustade med avgränsande bafflar. De osäkra resultaten rörde kärnan i att använda avancerad Bio-Trap, dvs. effekt av biostimulering och bioaugmentation på nedbrytning av de befintliga klorerade etenerna.

Osäkerheterna bestod delvis i att analyserade halter av klorerade etener i kontrollenheten var låga eller under detektionsgräns medan parallell analys av vattenprov uppvisade höga halter. Exempelvis, i GV52 befanns vattenprovernas innehåll av TCE, *cis*-DCE och VC vara 210 µg/l, 1300 µg/l resp. 1300 µg/l medan kontrollenheten i avancerad Bio-Trap var motsvarande < 12 µg/l, < 6 µg/l resp. 18 µg/l. Vattenanalys i GV1 visade 5,5 µg/l, 13 µg/l, 51 µg/l medan kontrolldelen i avancerad Bio-Trap visade < 12 µg/l, < 6 µg/l, 3,4 µg/l. För GV105 var motsvarande värden 2,9 µg/l, 320 µg/l, 280 µg/l mot < 12 µg/l, < 20 µg/l, 5,1 µg/l och i GV106 2,7 µg/l, 210 µg/l, 0,5 µg/l mot < 12 µg/l, ca 17 µg/l, 3,1 µg/l. Halterna av klorerade etener i avancerad Bio-Trap var alltså betydligt lägre, jämfört med halterna i det grundvatten de var placerade i. Därtill var motsvarande detektionsgränser i flertal fall signifikant högre i avancerad Bio-Trap kontrollenhet.

Då föreningar detekterades med halter i nivå med, eller under, detektionsgräns i MNA-enheten, samtidigt som de förelåg i omgivande vatten med signifikanta halter, så går det inte att nyttja de analyser av de passiva provtagarna som ska indikera eventuell ökad nedbrytning p.g.a. tillförsel av kolkälla eller bioaugmentation. Övrigt utfall med BioStim- och BioAug-enheterna blir därmed också osäkert. Man vet inte om det i realiteten funnits detekterbara halter initialt som med enheternas specifika innehåll har brutits ned. Vidare erhöles halter på fettsyror (bildade via fermentation) i olika delar av avancerad Bio-Trap-delarna som svårigen kunde ges rimlig förklaring om inte läckage mellan enheterna skett. Naturligtvis kan man inte likställa halter i passiva provtagare med reella halter i ett vatten, men de i detta test uppkomna avvikelserna är alltför stora för att utfallet från de olika delenheter i de nu testade avancerad Bio-Trap ska kunna jämföras fullt ut.

Erhållna diskrepanser gjorde alltså att bedömning av effekt av biostimulering (BioStim-enheten) och bioaugmentation (BioAug-enheten) på de klorerade etenerna inte fullt ut kunde utvärderas med avancerad Bio-Trap. Orsaken till diskrepanserna i uppmätta halter i vattenprover respektive kontrollenhet har inte gått att slutligt fastställa. Men rimlig förklaring är alltså att det skett läckage genom de bafflar som ska avgränsa enheten över- och underifrån. Detta stöds av utvärderingen från leverantören av de avancerad Bio-Trap (som också utförde analyserna av dessa) som anger att flera resultat kan antas varit påverkade av läckage mellan enheterna, s.k. ”cross-talk” (Bilaga 8). Varför sådant läckage skett genom de avgränsande bafflarna har inte gått att finna svar på.

Om läckage är den enda orsaken till de svårtolkade resultaten och om detta är systematiskt för komplett avancerad Bio-Trap borde det dock hypotetiskt vara möjligt och fördelaktigt att nyttja endast BioStim-enhet (eller ev. BioAug-enhet). Inga bafflar behövs då och eventuellt problem mellan enheterna undviks. Om t.ex. endast BioStim-enhet används skulle man kunna undersöka om förvald kolkälla ger någon tydlig förändring, t.ex. i bakteriekultur, jämfört med rådande situation. Undersökningen blir därtill mer avgränsad till mindre vertikal sträcka, jämfört med om man nyttjar tre enheter vertikalt intill varandra (som är fallet för den typ av avancerad Bio-Trap som här har testats).

8.1.3 Jämförelse avancerad Bio-Trap och standard Bio-Trap

Avancerad Bio-Trap består, förutom av en MNA-enhet (kontrollenhet), av en enhet med kolkälla (BioStim) och en enhet med kommersiella mikroorganismer (BioAug). Detta ska jämföras med standard Bio-Trap som i princip endast består av en förenklad MNA-enhet. Förenklingen innebär att standard Bio-Trap endast består av mikrobiell del medan MNA-enheten i avancerad Bio-Trap därtill kan bestå av ytterligare delar. MNA-enhetens alla delar kan sammantaget, förutom bestämning av mikrobiologin, härigenom även ge information om t.ex. halter av förorening, anjoner, fettsyror och pH.

Standard Bio-Trap saknar alltså den möjlighet som finns i avancerad Bio-Trap att analysera passivt provtagna fettsyror, anjoner, pH, lösta gaser och föroreningskomponenter. Då standard Bio-Trap därtill saknar avancerad Bio-Traps både BioStim- och BioAug-enheter så medger inte standard Bio-Trap en samtidig utvärdering av effekter av att tillföra kolkälla och mikroorganismer. För att göra dessa utvärderingar med standard Bio-Trap måste flera borrhål användas och injektioner måste göras i fält. För att via standard Bio-Trap få information om nedbrytningen kan ökas/påskyndas med möjliga saneringsaktiviteter, kopplade till förstärkt självrening (biostimulering/ bioaugmentation), krävs alltså större insatser.

Standard Bio-Trap ger i princip enbart information om mikrobiell status och mikrobiella förändringar kopplade till reduktiv deklorering. Föroreningskomponenter, anjoner och lösta gaser får provtas separat i grundvattenröret. Problemet med risk för korskontaminering ("cross-talk") finns dock inte med standard Bio-Trap. Risken för korskontaminering i avancerad Bio-Trap medför en viss utökning i analysprogrammet, i syfte att i efterhand kunna felsöka misstänka korskontamineringar. Denna osäkerhet gör att standard Bio-Trap ger mer tillförlitliga mikrobiella resultat.

Om fungerande avancerad Bio-Trap ger ett ökat värde i förhållande till standard Bio-Trap bedöms kunna skilja sig från plats till plats. Möjligheten av en kombination, bör eventuellt övervägas, inte minst av ekonomiska skäl då avancerad Bio-Trap är avsevärt dyrare än standard Bio-Trap. Här skulle t.ex. endast BioStim-delen kunna vara ett intressant komplement.

Oavsett standard Bio-Trap eller avancerad Bio-Trap så kan inte uteslutas att det, efter de 30-90 dagar som den passiva provtagaren sitter i grundvattnet, kan föreligga skillnader i mikrobiell sammansättning i Bio-Trap-sorbenten jämfört med i akvifären. Några orsaker till detta kan vara:

- a) skillnad i vattenflöde genom Bio-Trap i förhållande till genom jorden
- b) att vattnet i sorbenten som sådant eventuellt är mer stagnant än i närliggande akvifär
- c) att vattnet inte är direktkontakt med jorden
- d) att de i grundvattnet befintliga organismerna har annan fördelning gentemot de som finns i jordmatri-sen.

Generellt behöver dessa eventuella skillnader i förhållande till den mikrobiella statusen i akvifären värderas som minimala då Bio-Trap nyttjas. Därtill får man i praktiken tillåta sig att betrakta dessa skillnader som systematiskt fel.

8.2 Erfarenheter med qPCR

Tillämpningen av molekyllära analyser av gensekvenser som qPCR, har under de senaste åren tagit fart. Tillgängligheten har förbättrats samtidigt med att kostnaden reducerats. Rapporteringen är effektiv och snabb samt ger detaljerade resultat. qPCR fokuserar på gensekvenser, dels kopplade till typ av mikroorganismer, dels kopplade till sådana som kodar för produktion av olika enzymer som kan bryta ned föroreningar. Beroende på om analysen baseras på DNA eller RNA kan metoden ge information om mikrobiell nedbrytnings-potential respektive -aktivitet i ett prov.

Det finns många uppenbara fördelar med qPCR-teknik som ett verktyg för att karakterisera det mikrobiella samhället och fastställa potential för nedbrytning av klorerade etener till eten. Ett qPCR-svar som ligger över dess detektionsgräns innebär en säkerhet i att bakterierna verkligen förekommer i det provtagna mediet. Detekterad koncentration av mikroorganismerna kan därtill visa hur stor denna potential är. Resultatet kan också visa på osäkerheter i samband med provtagningen, spegla variationer i akvifären eller visa att önskade bakterier och/eller gener är närvarande om än i låga nivåer (nivåer som eventuellt kan stimuleras att ökas).

Nackdelar med qPCR idag är att man kommersiellt hittills erbjuder analys av bara ett fåtal betydelsefulla gensekvenser relaterade till reduktiv deklorering av klorerade etener samt ett relativt litet begränsat antal av olika typer av mikroorganismer, som ensamma eller i samspel kan utföra fullständig deklorering av klorerade etener till slutprodukten eten. Forskning och utveckling inom detta område går dock raskt framåt.

De mikrobiella analyserna med qPCR som utförts på sorbenter i både standard Bio-Trap och i avancerad Bio-Trap avsågs att ge specifik information om det aktuella innehållet av bl.a. *Dehalococcoides* spp. (DHC) och *Dehalobacter* spp. i provpunktens akvifär. Därtill avsågs att erhålla information om närvaron av mikroorganismer med funktionella gener kända att ha potential (analyserna fokuserade på DNA) att generera produktion av enzym som reduktivt kan bryta ned t.ex. TCE eller VC. Närvaro av dessa enzym är en väsentlig förutsättning för att motsvarande klorerat kolväte, t.ex. VC, inte ska koncentreras i området.

Sådan information är viktig för att klarlägga utgångspunkt och potential för användandet av reduktiv deklorering som saneringsmetod. Under saneringsförloppet är metoden avsedd att ge information om huruvida man uppnått önskad effekt av t.ex. biostimulering (som skett i föreliggande projekt), om nödvändiga förhållanden föreligger för fullständig nedbrytning (dvs. att nedbrytning kan ske hela vägen från ursprunglig klorerad eten ned till eten), eller om ytterligare förändringar krävs (t.ex. bioaugmentation, ytterligare biostimulering).

Antal qPCR-analyser som behövs för att få en rimlig täckning av området beror på det förorenade områdets utbredning men också på geologiska variationer, egenskaper hos grundvattnet (hydraulisk konduktivitet, grundvattenkemi, närvaro av flera magasin, m.m.) och förstås på förorenings uppträdande. Detta, tillsammans med de ekonomiska ramarna och löpande resultat, utgör underlaget för att bedöma antal och frekvens av mikrobiella qPCR-analyser. I det aktuella projektet bedöms framtaget underlag, tillsammans med det av WSP tidigare framtagna underlaget, varit tillfredsställande för att bedöma den mikrobiella utvecklingen över tid i de olika delarna av käll- och plym område. Behov av ytterligare qPCR-analyser bedöms dock föreligga för att klarlägga fortsatt utveckling av den mikrobiella nedbrytningspotentialen i de punkter där behov av nedbrytning fortsatt föreligger. Om det finns mer än ett förorenat grundvattenmagasin bör prover tas från samtliga.

Ett enkelt analyschema för mikrobiella qPCR-analyser som beslutsunderlag för biostimulering/bioaugmentation är dels en analysomgång för att utvärdera möjligheten (dvs. innan några beslut är tagna), dels en analysomgång ett par månader efter att injektioner genomförts och dels ett lämpligt begränsat antal under en efterföljande 1-2 års period för att bedöma utfallet från injektionen och eventuellt behov av ytterligare injektioner. qPCR-resultaten bör alltid utvärderas tillsammans med förändringar i föroreningskoncentrationer, analys av kvarvarande kolkälla och andra relevanta parametrar inklusive geokemiska förhållanden.

Utöver att använda qPCR-analys på sorbenter i Bio-Trap kan qPCR även användas på grundvatten och jordprov, i det senare fallet vanligtvis med s.k. mesocosmer (permeabla behållare med jordprov). Bio-Trap är designad för att avspegla det immobile mikrobiella samhället i jorden. Då mesocosmer för reduktiv deklorering är förknippade med speciella prepareringsarbeten (upptag av jordkärna samt uttag av jordprov från kärnan och preparering av mesocosm med återinsättande i grundvattenrör kräver i alla steg

anaeroba förhållanden) kan det mer enkla handhavandet av Bio-Trap vara fördelaktigt. Huruvida qPCR på Bio-Trap kan ersätta qPCR på jordprov (mesocosmer) har dock inte undersökts i föreliggande studie.

Eventuella skillnader i mikrobiella nedbrytningsaktiviteter mellan vattenprov och fastfas i Bio-Trap har inte undersökts. Mikroorganismer i vattenprov skulle kunna vara i ett mer rörligt/resande stadium (än de immobila i Bio-Trap) under vilken nedbrytningen (och därmed reell aktivitet hos motsvarande gener) kanske inte är lika prioriterad som för de immobiliserade (sittande på en yta). Detta skulle kunna avspeglas i skillnader i utfallet från qPCR på RNA-gener i de olika provtagningsmedierna.

Huruvida bakomliggande orsaker till de osäkerheter som erhållits, med de avancerad Bio-Trap provtagarna i föreliggande projekt, kan ha påverkat qPCR-utfallet från deras kontrollenheter är oklart med bör förutsättas ha skett. Huvuddelen av qPCR-analyserna utfördes dock i föreliggande projekt, och av WSP dessförinnan, på standard Bio-Trap som bedöms ha gett tillförlitliga resultat.

8.3 Erfarenheter med PLFA

Med PLFA analyseras fettsyror i mikroorganismernas cellmembran. Dessa fettsyror är huvudkomponenter i membranen och bryts snabbt ned då organismerna dör. Analysen ger därför information om den levande mikrobiella strukturen vid provtagningstillfället. Att inkludera PLFA i en bedömning av hur nedbrytningen fortlöper ger dock endast översiktlig information om den mikrobiella miljön. Vid upprepade analyser kan förändringar studeras och användas som stöd vid utvärdering av andra analyser. Liksom flera andra verktyg för biologisk analys bör resultat från PLFA tolkas tillsammans med föroreningsfördelning och nivåer, den hydrogeologiska miljön och geokemiska parametrar (pH, redoxförhållanden, metan, m.m.).

Som beskrivits har analyser av PLFA använts i föreliggande projekt för att värdera tre nyckelparametrar i det mikrobiella samhället: levande biomassa, det mikrobiella samhällets sammansättning och dess metaboliska status (de individuella fettsyrorerna skiljer sig åt främst beroende på vilka organismer som är närvarande). Sammansättningen av de analyserade fettsyrorerna är emellertid ospecifik, dvs. den ger ingen information om specifika föroreningsnedbrytande mikrobiella populationer. Enbart PLFA-analys kan inte användas för att bedöma och dokumentera den mikrobiella miljöns potential eller reella aktivitet för nedbrytning av klorerade etener till eten. PLFA bör därför användas som ett komplement till exempelvis qPCR-analyser.

I projektet har PLFA-analyser bidraget till att göra generella bedömningar av tillväxt eller minskning av aktiv biomassa. Analyserna av PLFA har vidare visat att det efter biostimuleringen skett en ökning av vissa bakteriegrupper nödvändiga för reduktiv deklorering (Firmicutes (TerBrSats)). Sammantaget visar detta att utvecklingen i saneringsområdet går i önskad riktning.

Då PLFA ger information om den "levande" mikrobiella strukturen vid provtagningstillfället kan analyser av PLFA vid olika tidpunkter ge en god förståelse för dynamiken i området. Till exempel kan det användas för att övervaka mindre områden utan förorening, inbäddade i större förorenade områden. Övervakningen kan exempelvis göras före en eventuell biostimulering och flera gånger efter biostimuleringen för att följa utvecklingen i de olika delarna av saneringsområdet, plymen, och med fördel också i en referenspunkt uppströms området. Som i all annan provtagning är noggrant planlagt fältarbete, rätt utrustning, korrekt hantering i fält och under transport samt lagring viktiga för att säkra kvaliteten.

Som visat i projektet så kan det vara stora variationer i innehållet av de viktigaste mikroorganismerna. Härav är det värdefullt att prov tas ut från olika delar av saneringsområdet, t.ex. i olika delområden i källområdet, i plymen och i olika geologiska lagersekvenser. Det är därför, som alltid, viktigt att ha en täckande och tillräckligt detaljerad kunskap om geologin i saneringsområdet, om föroreningsfördelningen

samt de hydrologiska förhållandena/variationerna. En tidsserie av mikrobiella ögonblicksbilder visar utveckling över tid och rum men måste ha ursprungsvärden som erhållna resultat kan jämföras med.

Sammantagna erfarenheter från projektet är att qPCR-analys gett, för det aktuella området, betydligt mer värdefull information än PLFA-analys. Om det nu aktuella området istället hade uppvisat generellt mycket svag mikrobiell nedbrytningsaktivitet efter biostimuleringen skulle PLFA eventuellt kunna ge mer värdefull information, t.ex. indikation på om detta berodde på att grupper av icke-önskvärda mikroorganismer tagit över i akvifären.

8.4 Erfarenheter med isotopundersökningar

8.4.1 Inverkan av nedbrytningssätt

CSIA är ett av flera verktyg för att värdera kvalitativt och kvantitativt omfattning av bl.a. reduktiv deklorering av klorerade etener. Vanligtvis används då förhållande mellan två olika kolisotoper i de klorerade etenerna varvid utfallet ger information om t.ex. effekt av biostimulering och/eller bioaugmentation.

Erhållna haltförändringar kan vara orsakade av fysikaliska processer. Även om både ursprungsförening och dess reduktivt deklorerade nedbrytningsprodukter föreligger med olika halter från tid till annan så kan man inte enbart basera omfattningen av nedbrytningen på dessa haltförändringar. De senare kan naturligtvis orsakas av nedbrytning men de kan också orsakas av temporära tillflöden uppströms eller bortförel till nedströms liggande områden (eller av utspädning, förångning, fastläggning, m.m.). Här har CSIA styrka eftersom den ger information om den del av haltförändringarna som beror av nedbrytning.

Nedbrytning av ursprungsförening av klorerad eten och den totala nedbrytningen till icke klorerade produkter kan enkelt bedömmas, förutsatt att det finns tillräckligt goda bakgrundsvärden för icke nedbruten ursprungsförening. Eftersom de genom reduktiv deklorering bildade nedbrytningsprodukterna både kan bildas och brytas ned, kan resultatet för de enskilda produkterna bli mer svårtolkat. Erfaren expert kan dock även bedöma omfattningen av nedbrytning av alla enskilda klorerade nedbrytningsprodukter.

En annan fördel med CSIA är att man med metoden kan skilja på om nedbrytning i form av deklorering av klorerade etener sker biotiskt eller abiotiskt då dessa processer ger signifikant differens i isotopkvoter (US EPA, 2008). CSIA-analys kan även användas för att räkna fram nedbrytningskonstanter som i sin tur kan ingå som del i prognos av föroreningsutvecklingen.

I föreliggande fall har information erhållits att deklorering sker längs hela kedjan av klorerade etener (dvs. fullständig deklorering), via isotopanalyser men även via haltanalyser av bl.a. eten samt via dekloreringsgrad. Haltanalyser och dekloreringsgrad ger ingen specifik information om huruvida dekloreringen i olika nedbrytningssteg är biotiskt eller abiotiskt baserade. Däremot, erhållna isotopresultat pekar på att nedbrytningarna till stora delar är biotiskt baserade.

Sammanfattningsvis konstateras att genomförda CSIA-undersökningar har visat på flera fördelar, men metoden kan även ha nackdelar eller egenheter som man måste beakta.

Den främsta nackdelen bedöms vara att det behövs ganska många provpunkter för ett bra bedömningsunderlag. Detta beskrivs närmare i nästa avsnitt.

En effekt som eventuellt skulle kunna vara till nackdel är att isotopkvoterna blir annorlunda om signifikant mikrobiell oxidativ nedbrytning av klorerade etener sker, jämfört med enbart mikrobiell reduktiv deklorering. Vanligtvis är dock oxidation av TCE försumbart låg (och för PCE icke-existerande), relativt reduktiv deklorering. Men om man vill undersöka den sammantagna reduktiva dekloreringen ned till eten kan signifikant oxidation av VC, och i viss mån av *cis*-DCE, ge högre viktat värde på samlingsparametern

$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$, jämfört med om endast reduktiv deklorering sker. Detta kan naturligtvis vändas till en fördel, om man vill utvärdera omfattningen av signifikant oxidation, men bra utvärdering av sådan oxidation kräver stor erfarenhet/expertkunskap.

Fördelningen av tunga och lätta isotoper, t.ex. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, i ett prov varierar platsspecifikt över tiden. Fördelningen är bl.a. beroende av aktiva mikroorganismer, koncentration av förorening, intermediärer och mineraliserade föreningar samt typ av dekloreringsmekanism. Detta kan försvåra kvantifiering av den mikrobiella andelen av haltförändringen. Exempelvis, klorerade etener kan med tiden brytas ned fullständigt. Detta innebär att även molekyler med tunga isotoper med tiden bryts ned. Fördelningen mellan lätta och tunga isotoper över tid blir alltså beroende av flera olika platsspecifika faktorer.

Det kan tilläggas att även förorening som sådan kan ha olika isotopkvoter. Föroreningsituation där både gammalt och nyare spill skett kan generera svårigheter i utvärderingen. Enligt Isodetect (2012) kan ursprungliga, icke nedbrutna, kommersiella kolbaserade föreningar som industriellt producerades före 1940-talet (t.ex. PCE eller TCE), uppvisa mer negativa $\delta^{13}\text{C}$ -värden jämfört med om samma föreningar producerades senare.

8.4.2 Provtagningens inverkan

Den främsta nackdelen med CSIA kan bedömas vara att det behövs analyser av grundvatten från ganska många provpunkter för att få ett underlag för bra bedömning. Inte minst viktigt är att isotopkvoter analyseras i tillräckligt många punkter före en aktiv åtgärd för att kunna erhålla bra bakgrundsvärde på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$. Aepli et al. (2010) fann säkerställt bakgrundsvärde ur några tiotal provpunktsvärden. I föreliggande undersökning har mindre än tio punkter provtagits vid minst ett tillfälle och sammantaget har endast ett fåtal provresultat kunna ge beräkningsbart $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ värde (vilket gjort bl.a. att platsspecifikt bakgrundsvärde på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ är osäkert).

En viktig faktor för relevant utvärdering av nedbrytning, baserad på CSIA, är även provtagningen i sig. Utvärdering av isotopkvoter, $\delta^{13}\text{C}$, kräver förståelse av vad det provtagna och analyserade vattnet representerar, vilket i sin tur till del beror av provtagningen. Om t.ex. ett grundvattenrör inte omsätts före provtagning så motsvarar resultatet situationen främst i det vatten som finns i röret. Detta vatten kan skilja sig avsevärt från akvifärens vatten (som blir huvuddelen i ett omsatt grundvattenrör). Flyktiga föreningar kan ha avgått upp i röret och/eller syre kan ha kommit ned genom röret och löst sig i vattnet. Detta kan resultera i att den reduktiva deklorering som pågår i akvifären har avstannat i rörets vatten. $\delta^{13}\text{C}$, som ska avspegla akvifären, kan då ge missvisande resultat. Det är alltså viktigt att det vatten som provtas representerar akvifären i den omkringliggande provpunkten. Detta gäller naturligtvis även för alla andra parametrar som ska representera akvifärens status.

Vad provtagningen avspeglar är även beroende av bl.a. längd och placering av filtret i röret, samt även hur mycket vatten som pumpas upp. Om ett vattenprov motsvarar olika nedbrytningszoner (olika nedbrytnings-typer och -hastigheter med olika isotopkvoter) kan utvärdering av $\delta^{13}\text{C}$ -värden bli missvisande. Analys av geokemiska parametrar, parallellt med isotopanalys, kan ibland ge fingervisning. US EPA (2008) anger att man inte bör mäta eller beakta $\delta^{13}\text{C}$ -värden om exempelvis både höga Fe^{3+} - och sulfidhalter detekteras och/eller lågt redox, samtidigt som nitrat- och eventuellt syrehalter överstiger 1 mg/l. Sådana kombinationer indikerar att provet är taget på ett sådant sätt att det motsvarar en blandning av flera olika redoxzoner och därmed olika nedbrytningszoner vilket kan ge svårbedömda isotopkvoter.

8.5 Osäkerhet i dekloreringsgrad för klorerade etener

Sanering av klorerade etener med mikrobiella metoder nyttjar generellt reduktiv deklorering eftersom främst PCE (och i viss mån TCE) inte kan oxideras mikrobiellt. Mikrobiell s.k. klorrespiration (reduktiv deklorering där föreningen nyttjas som energikälla av mikroorganismen) förekommer i akvifärer under

anoxa/anaeroba förhållanden. Nedbrytning av lågklorerade etener kan dock ske antingen via klorrespiration eller genom rent oxidativa processer. De senare kan ske fastän redox är relativt lågt.

Ibland visar analyser att grundvattnet innehåller låga–mycket låga halter/under detektionsgräns av nedbrytningsprodukterna *cis*-DCE eller VC. Detta tolkas vanligtvis så att dekloreringen av TCE till *cis*-DCE är låg. Om *cis*-DCE halten är signifikant men VC-halten är låg tolkas detta vanligtvis så att dess deklorering till VC är låg/ringa. Därtill, då låga/mycket låga syrehalter detekteras i en kloreten förorenad akvifär, samtidigt som bevis föreligger att DCE eller VC bildas, bedöms allmänt förhållandena vara sådana att reduktiv deklorering är den enda processen som är relevant.

Ovanstående beskrivning är en generellt accepterad uppfattning som dock Bradley (2011) anser kan ha inneboende felaktigheter. Bradley menar att man bör ta hänsyn till resultat från Bradley & Chapelle (2011). De har visat att DCE och VC kan genomgå både reduktiv och oxidativ nedbrytning i signifikant omfattning fastän syrehalten är relativt låga (dock vid oxidativ nedbrytning får syre i sådana fall inte vara fullständigt frånvarande). Man fann att DCE och VC kan genomgå signifikant oxidativ nedbrytning i vatten vid så låga syrehalter som ca 0,1 mg/l (för VC eventuellt vid ännu lägre syrehalter). Dessa oxidationsprocesser anses dock förutsätta att redox inte är så lågt att signifikant sulfatreduktion sker. Detta innebär att det under vissa förutsättningar kan ske både reduktiv deklorering och oxidativ mineralisering av VC, men att små variationer i förutsättningarna troligtvis ger stor variation i de olika processernas hastigheter.

Det är viktigt att ha i åtanke att dekloreringsgraden (DKG) endast indikerar omfattning av dekloreringen, inte omfattningen av den totala nedbrytningen av de klorerade etenerna (inkluderande eventuell oxidativ nedbrytning). Storleken på DKG är beroende av halten av de detekterade, eller frånvaro av de, klorerade etenerna, samt av eten och etan. Om enbart TCE och *cis*-DCE föreligger (inget VC och eten detekteras) resulterar detta i en relativt låg dekloreringsgrad. Men om VC bildats i signifikant omfattning och därefter oxiderats så att dess halt, och därmed även eten/etan halterna, är låga blir den totala reella nedbrytningen större än dekloreringen (eftersom en del av de klorerade etenerna brutits ned genom oxidation). Därmed blir även förändringen av DKG-värdet över tid liten men i detta fall innebär det inte att nedbrytningen har avstannat. Värdet på DKG indikerar bara storlek på nedbrytningen via deklorering. Därtill om VC deklorerats men inget eten/etan detekteras (för att de har oxiderats) ger även denna situation en mer omfattande nedbrytning än vad DKG avspeglar.

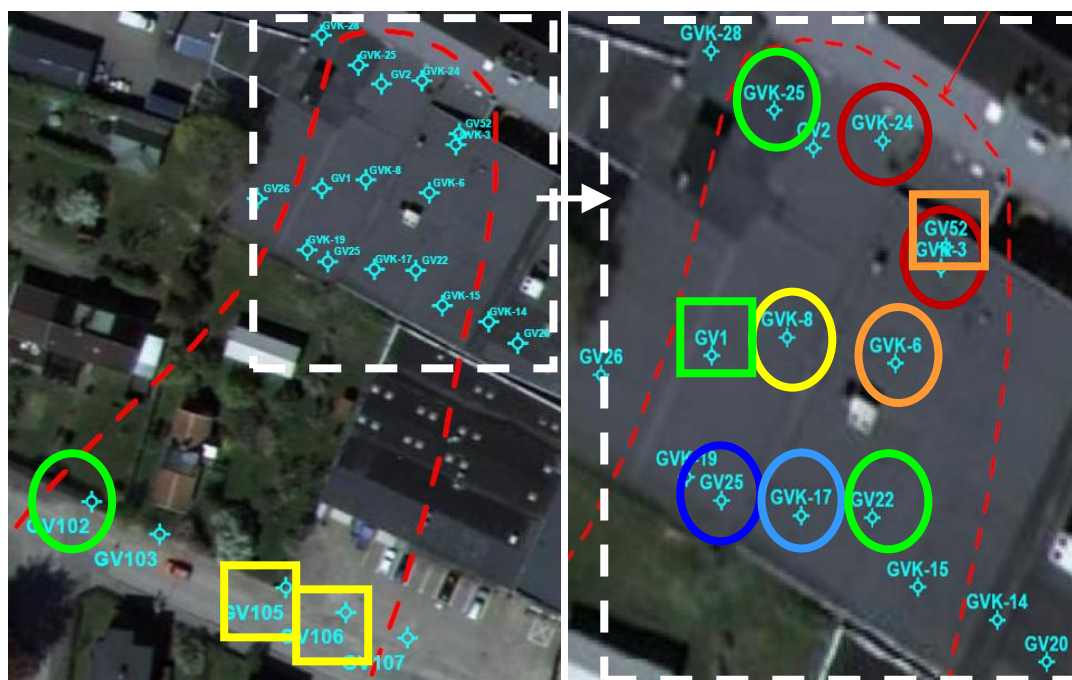
Klorerade etener kan även kemiskt dekloreras (abiotisk deklorering) men då produkterna är andra än de som ingår i ekvationen för DKG kan värdet på DKG indikera lägre dekloreringsgrad än vad som reellt skett. Abiotisk deklorering är dock relativt sällsynt men kan ibland vara icke-försumbar, t.ex. i närvaro av nollvärt järn eller järnsulfider (Larsson, 2009).

Beräkningen av DKG görs mot bakgrund av innehåll i grundvattenprover uttagna i en dynamisk ”öppen miljö”. Detta bör också beaktas vid värderingen av DKG. Förhållandena (osäkerheterna) är systematiska, och gäller specifikt vid provtagningen från tid till annan. Förutom nedbrytning kan DKG i grundvattenprov påverkas av kemiska och fysiska egenskaper hos enskilda föreningar (gasavgång, m.m.). Därutöver kan förstås osäkerhet i analyser och provtagning medverka till variationer i beräkningsunderlaget.

Med beaktande av nämnda osäkerheter så ger DKG ändå acceptabel indikation på hur dekloreringen utvecklar sig över tid och ger därmed värdefullt underlag för bedömning av nedbrytningsprocessen. DKG bör dock användas som del i en samlad bedömning, där man överordnat studerar utvecklingen över tid och rum av föroreningskomponenternas samlade massa och flux, såväl i källområdet som i pplymen.

8.6 Preliminär bedömning av nedbrytningsstadium i källa och plym

I Figur 8.1, samt i efterföljande text, ges en grövre preliminär bedömning av aktuell situation från dålig–god i de punkter som utvärderats i tidigare kapitel. Bedömningen är subjektiv och baseras på en kombination av hur långt dekloreringen 2012 har gått, kvarvarande halter samt mikrobiell nedbrytningspotential och aktivitet. Underlaget till bedömningen är resultat presenterade och diskuterade i tidigare kapitel och sammanfattas i det följande.



Figur 8.1 Grövre preliminär bedömning, markerad med färgskala, av situationen 2012 i de provpunkter vars grundvatten på något sätt undersökts i föreliggande projekt, undantaget GVK24 och GVK25. Färgskalan beskrivs i text. Observera färgskillnaden mellan GV25 (mörkblå) och GVK17 (ljusblå). Fyrkanter visar placering av avancerad Bio-Trap. Underlagsfoto med provpunktsplaceringar från WSP (2010a).

Bedömningen i Figur 8.1 görs visuellt med färg med ordningsföljden röd-orange-gul-grön-ljusblå-mörkblå, där mörkblå (representerad av provpunkt GV25) har bästa relativa förhållande (hur långt nedbrytningsprocessen gått och förutsättningar för fortsatt nedbrytning). Fyrkanter visar placering av avancerad Bio-Trap. Övriga markerade punkter, undantaget GVK24 och GVK25, visar placering av standard Bio-Trap. Analyser utförda i de markerade punkterna, med givna undantag, gavs i Tabell 6.2. Punkterna GVK24 och GVK25 är medtagna i bedömningen då de bedömts ge lämplig kompletterande information om den totala situationen. Kompletterande information är inhämtad från WSP (2010a; 2010b, 2010c, 2012).

Jämförs värden före injektion med värden efter injektion fås att injektionen av kolkälla har haft en förbättrande effekt på nedbrytningen generellt sett. Storleken på effekten varierar dock från punkt till punkt. Det bör bedömas som tillfredställande att det pågår fullständig nedbrytning av de klorerade etenerna i de allra flesta av provpunkterna.

Sammantaget fås att i källområdet pågår en tydlig fullständig deklorering (nedbrytning i alla dekloreringssteg med produktion av eten) i GVK25 och delvis även i GV52. De höga halterna av alla klorerade etener i GV52 har dock negativt påverkat den sammantagna bedömningen (orange färg) i Figur 8.1. Det pågår deklorering även i GVK24 och i GVK3 men här är dekloreringen inte fullständig (låg/ringa nedbrytning av *cis*-DCE i GVK24 och av VC i GVK3). Status i bl.a. GV52 indikerar dock att mikrobiell potential finns i den absoluta närheten av GVK3.

I nedre delen av källområdet pågår fullständig nedbrytning i alla de tre provtagna punkterna GV1, GVK8 och GVK6. I GVK6 synes dock dekloreringshastigheten avtagit på senare tid. Visserligen är halterna av några av de klorerade etenerna över, eller avsevärt över, åtgärdskraven (samt ökar rumsligt mot detta områdes östra del) men situationen i övrigt tyder på att GV1 och eventuellt GVK8 inom en inte alltför lång framtid (uppskattningsvis några år) har nått under kraven.

I området strax nedströms källområdet, med punkterna GV25, GVK17, GV22, föreligger fullständig nedbrytning med hög dekloreringsgrad. Visserligen är halterna av VC i några av punkterna strax över åtgärdskrav men situationen är god för att dessa ska nå under åtgärdskraven inom snar framtid (uppskattningsvis något år).

I området i plymen ca 40 m nedströms källområdet, representerat av GV102, GV105 och GV106, sker en tydlig fullständig nedbrytning i GV105 men marginellt i GV106. GV105 har dock en högre total molmassa än GV106 vilket sammantaget gett samma färgbedömning av dessa. Nedbrytningen i detta område synes inte ha gått lika långt som i det närmast uppströms liggande området. Detta kan hypotetiskt bero på att plymen i detta område ännu inte har signifikant påverkats av biostimuleringen i källan. En prognos av bl.a. detta delområdes framtida haltutveckling bör göras, baserat på tidsberoende förändring av haltutvecklingen i hela området.

8.7 Behov av bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering?

De testade avancerad Bio-Trap provtagarna bedöms ha gett osäkra resultat avseende effekt av bioaugmentation och biostimulering. Med detta i beaktande indikerar resultaten att eventuell tillsats av valda mikroorganismer, tillsammans med kolkälla, i källområdets GV1 endast skulle kunna ge marginell förbättring. I källområdets GV52 gav BioAug-enheten en viss koppling mellan markant ökat antal av kloreten-nedbrytande mikroorganismer, kloreten-nedbrytande mikrobiella enzymer (bl.a. VC-nedbrytande) och markant ökad etenhalt. I GV52 skulle alltså bioaugmentation tillsammans med biostimulering eventuellt kunna ge signifikant förbättring, speciellt avseende nedbrytning av VC. Utfallet av avancerad Bio-Trap i GV52 indikerar att eventuell ytterligare tillsats av enbart kolkälla inte kommer att förbättra situationen i källområdets GV1. Eventuellt inte heller i källområdets GV52 skulle tillsats av enbart kolkälla ge någon förbättring.

En sammantagen bedömning ger preliminärt att det inte är till väsentlig fördel att utföra någon generell bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering. Detta eftersom status i de flesta punkter visar både närvaro av mikrobiell potential att bryta ned, samt bevis på reell nedbrytning av VC till eten. Det bör dock beaktas att de mikrobiella analyserna utfördes på DNA (och inte RNA) vilket inte ger information om pågående enzymaktivitet (som deklorerar etenerna), utan endast visar potential för sådan aktivitet. Bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering bör eventuellt övervägas lokalt i de delområden där den fullständiga dekloreringen går långsamt. Sådana delområden indikeras av betydande kvarstående halter av speciellt VC (och i viss mån av *cis*-DCE) i provtaget grundvatten, samtidigt som standard Bio-Trap i samma punkt visar lågt antal *Dehalococcoides* spp. och lågt till måttligt antal *Dehalobacter* sp. samt mycket lågt innehåll av *tceA*, *bvcA* och *vcrA*.

I källområdet bör fokus främst läggas på GVK24 och GVK3. Om dekloreringen här inte förbättras inom något år bör den lokala situationen undersökas med övervägande om eventuell bioaugmentation och eventuellt ytterligare biostimulering.

I den nedre delen av källområdet är utvecklingen osäker i framför allt GVK6 (och eventuellt i GVK8). Behov av bioaugmentation och eventuell ytterligare biostimulering bör övervägas om situationen inte signifikant förbättras inom något år.

Framtida utveckling i området strax nedströms källområdet samt i området i plymen ca 40 m nedströms källområdet kommer sannolikt att påverkas av utvecklingen uppströms.

Bedömning av behov av bioaugmentation och/eller biostimulering bör alltid kopplas till pH i akvifären. Om pH är alltför lågt bör först effekt av en enkel pH-höjning/pH-buffring (förutsatt pH är signifikant under pH6) på tillväxt av önskade mikroorganismer utvärderas. Bedömning bör även kopplas till eventuellt pågående metanproduktion. Om höga metanhalter föreligger kan denna metanproduktion eventuellt motverka mikrobiell deklorering av etener.

8.8 Kostnader för Bio-Trap och CSIA

Nedan givna prisuppgifter gällde under inledning av 2012 (baserat på då gällande växelkurs SEK/\$ och SEK/€).

8.8.1 Standard Bio-Trap

Standard Bio-Trap samt mikrobiell analys (specifika bakterier, gener och PLFA) av denna kostar ca 12 000 SEK/enhet (utförs av Microbial Insights, USA). Till detta tillkommer provtagnings- och transportkostnader.

8.8.2 Avancerad Bio-Trap

Kostnader för testad utrustning inklusive kopplade analyser (utförs av samma amerikanska företag, Microbial Insights, som levererar utrustningen) var följande:

MNA Unit innehåller, samt ger analys av:

- Advanced Bio-Trap (Advanced Bio-Trap Unit-MNA)
- Advanced Bio-Trap (Contaminant of Concern)
- Advanced Bio-Trap (Anions)
- Advanced Bio-Trap (Dissolved Gases)
- Advanced Bio-Trap (Total Organic Carbon)
- CENSUS-DNA (Dehalococcoides spp.--DHC)
- CENSUS-DNA (bvcA Reductase--BVC)
- CENSUS-DNA (tceA Reductase--TCE)
- CENSUS-DNA (Vinyl Chloride Reductase--VCR)
- Advanced Bio-trap (Set-up, reporting and misc. supplies)

Kostnad per enhet, inkl. frakt och angivna analyser: ca 12 000 SEK

BioStim Unit innehåller, samt ger analys av:

- Advanced Bio-Trap (Advanced Bio-trap Unit-BioStim)
- Advanced Bio-Trap (Contaminant of Concern)
- Advanced Bio-Trap (Anions)
- Advanced Bio-Trap (Dissolved Gases)
- Advanced Bio-Trap (Total Organic Carbon)
- CENSUS-DNA (Dehalococcoides spp.--DHC)
- CENSUS-DNA (bvcA Reductase--BVC)
- CENSUS-DNA (tceA Reductase--TCE)
- CENSUS-DNA (Vinyl Chloride Reductase--VCR)
- Advanced Bio-Trap (Set-up, reporting and misc. supplies)

Kostnad per enhet, inklusive frakt och angivna analyser: ca 16 000 SEK

BioAug Unit innehåller, samt ger analys av:

- Advanced Bio-Trap (Advanced Bio-trap Unit-BioAug)
- Advanced Bio-Trap (Bioaugmentation culture)
- Advanced Bio-Trap (Contaminant of Concern)
- Advanced Bio-Trap (Anions)
- Advanced Bio-Trap (Dissolved Gases)
- Advanced Bio-Trap (Total Organic Carbon)
- CENSUS-DNA (Dehalococcoides spp.--DHC)
- CENSUS-DNA (bvcA Reductase--BVC)
- CENSUS-DNA (tceA Reductase--TCE)
- CENSUS-DNA (Vinyl Chloride Reductase--VCR)
- Advanced Bio-Trap (Set-up, reporting and misc. supplies)

Kostnad per enhet, inklusive frakt och angivna analyser: ca 20 000 SEK

Om PLFA-analys önskas i någon av de avancerad Bio-Trap provtagarnas delenheter ovan ökar kostnaden med ca 7 000 SEK per analys och enhet (analyskostnad hos Microbial Insights, USA).

8.8.3 CSIA

Om CSIA-analys önskas kopplas till någon av de avancerad Bio-Trap-enheterna ovan ökar kostnaden med ca 8 000 SEK per analys och enhet.

Om CSIA analys, som fokuserar på att kvantifiera kolisotoperna ^{12}C och ^{13}C , önskas utföras i vanligt grundvattenprov så ligger kostnaden i Europa på 5 000–6 000 SEK/prov för paket med klorerade etener. I detta ingår kostnader för parallell analys av halterna av de ämnen vars isotoper kvantifieras. Därtill tillkommer kostnader för provtagning och transport. Vid behov kan även kostnader tillkomma för enkla eller mer avancerade utredningar utförda av analyslaboratoriet.

9 Slutsatser och rekommendationer

I detta kapitel ges inledningsvis slutsatser som efterföljs av rekommendationer, baserade på erfarenheter från projektet, som kan ha generell tillämpning. Därefter ges rekommendationer, baserade på erfarenhetet från projektet, som har platsspecifik tillämpning.

9.1 Slutsatser

Projektet har visat att analys av förbestämda gensekvenser hos bakterier i kloretenförorenad akvifär är ett mycket bra hjälpmedel för att kunna fastställa koncentrationer av bakterier och enzymer med potential att bryta ned föroreningarna. Detta är ett betydande hjälpmedel för att kunna fastslå de mikrobiella förutsättningarna för fortsatt nedbrytning av föroreningarna. Kompletterande analys av fettsyror i bakteriernas cellmembran (PLFA) ger endast grovre information om bakteriesamhället och bedöms inte behöva analyseras lika frekvent som gensekvenserna utan endast då man vill ha generell överblick över det mikrobiella samhället.

Analys av kolisotoper i förorening har visat sig kunna ge direkt bevis på huruvida haltminskning av förorening beror på nedbrytning eller inte. Utvärderingen är dock relativt komplicerad och för att kunna dra nytta av resultaten fullt ut bör data utvärderas av expert, t.ex. hos det företag som utför isotopanalyserna.

Projektet har testat en ny typ av verktyg/passiv provtagare, s.k. avancerad Bio-Trap, som kan laddas med dels utvalda mikroorganismer och dels kolkälla innan det placeras i ett förorenat grundvatten i upp till 90 dagar. Men kemisk och biologisk analys av olika delar av denna provtagare kan man principiellt få information om huruvida framtida tillsats av mikroorganismer och/eller kolkälla till akvifären kan påskynda nedbrytningen av förorening i akvifären. Avancerad Bio-Trap har potential att ersätta kostnadskrävande pilottester i fält under vilka fullskaliga injektioner av kolkälla och/eller mikroorganismer i annat fall kan behöva utföras. Därtill kräver vanligtvis sådana pilotfälttester anmälan enligt 28 § förordningen om miljöfarlig verksamhet och hälsoskydd vilket verktyget inte kräver. Erfarenheter från projektet är att avancerad Bio-Trap har stor potential men att verktyget ännu inte är fullt utvecklad för att motstå negativ påverkan från verktygets olika avgränsade delar.

9.2 Generella rekommendationer

Generellt sett är det alltid viktigt med grundläggande och kvalitetssäkrade data avseende bakgrundsmiljön (en s.k. "base line") i olika typer och delar av föroreningsområden. Som alltid är det också viktigt med god förståelse avseende förorening, geologi och hydrologi. Detta gäller både när man utför den inledande designen av saneringsåtgärden och när man utför efterföljande övervakning och bedömning av miljöeffekter eller värderar behov av ytterligare insatser.

När mikrobiella analyser ska tillämpas, och i samband med att provtagningsplanen utformas, bör syftet med provtagningen klargöras. Det är viktigt att mikrobiella resultat alltid utvärderas tillsammans med annan information om geologi, hydrogeologi, geokemi och föroreningsdata.

Det är naturligtvis viktigt att man följer upp effekterna av biostimuleringen och/eller bioaugmentationen (den mikrobiella utvecklingen, geokemi och föroreningshalter) för att dokumentera effekten av saneringsåtgärden. Likaledes bör uppföljning göras för att bedöma behov av kompletteringar, dokumentera miljövinster i förhållande till uppsatta saneringskrav eller för att uppmärksamma förhållanden som riskerar att dämpa den mikrobiella aktiviteten.

Nämnda uppföljningar innefattar lämpligen tidsserier för att kunna bedöma förändringarna. I en situation där ett nedbrytningsförlopp endast övervakas (dvs. då varken biostimulering eller bioaugmentation utförts) bedöms en lämplig tid mellan provtagningar vara ca 1 år. Ska biostimulering eller bioaugmentation utföras styrs provtagningsfrekvensen av utvecklingen i fält. Lämplig provtagningsfrekvens kan vara 3 månaders mellanrum under de första 1–2 åren, varefter frekvensen glesas ut till 6–12 månaders mellanrum, beroende på t.ex. typ och mängd av tillsatt kolkälla och dess fermentationshastighet, dekloreringshastigheter, metanproduktion, ekonomi och krav i övrigt.

Generellt bör ett analys-/kontroll-program som bas innefatta andra parametrar än klorerade etener. Exempel på sådana parametrar är fältparametrarna redox, löst syre, elektisk konduktivitet, temperatur och pH. Dessa parametrar kan analyseras med högre frekvens än övriga analyser i ett kontrollprogram (t.ex. föroreningskemi, metanhalt, fettsyror, mikroflora och gensekvenser). Dessa enklare analyser kan ge bra stöd i ökad förståelse av hur förhållandena utvecklar sig i hela eller delar av området eller i ett utvidgat område.

Fältmätningar av enkla geokemiska parametrar som pH, redox, löst syre, m.m. bör alltså så ofta som lämpligt och möjligt mätas för att, tillsammans med mer kostsamma och därmed mer sällan utförda undersökningar/analyser, erhålla indata till eventuella temporära styrningar av den mikrobiella nedbrytningen.

Passiva provtagare av typen standard Bio-Trap ger bra information som kan ingå som del i underlag för inledande bedömningar av ett områdes utgångssituation samt potential för reduktiv deklorering. De kan med fördel användas i kombination med fältinjektioner för att utvärdera möjliga effekter med biostimulering eller bioaugmentation. Användande av avancerad Bio-Trap har för avsikt att, utöver vad standardvarianten ger, kunna ge mer specifika underlag för att bedöma fördelar i samband med eventuellt kommande biostimulering och/eller bioaugmentation. Det är av yttersta vikt att de olika segmenten/enheterna i avancerad Bio-Trap inte påverkar varandra (läckage mellan enheterna), vilket annars ger svårtolkade och missvisande resultat.

I de fall olika kolkällor eller bakterieblandningar testas i avancerad Bio-Trap bör man vara uppmärksam på variationer beroende på inhomogeniteter mellan de olika provpunkterna. Resultaten bör därtill, som nämnts, utvärderas tillsammans med geologi, hydrologi, föroreningskaraktistik, geokemi, m.m.

PLFA-analyser visar den överordnade utvecklingen av den mikrobiella miljön. Mer betydelsefullt i en utredning är dock vanligtvis att klarlägga, via t.ex. qPCR-analyser, om önskade mikroorganismer (t.ex. *Dehalococcoides*, *Dehalobacter*) finns i tillräckligt mängd. Därtill att de har aktiva specifika gensekvenser för utförande av reduktiv deklorering av de aktuella klorerade lösningsmedlen, för fullständig nedbrytning till icke-klorerade nedbrytningsprodukter. Emellertid, om den bakteriella situationen är dålig med avseende på dekloreringspotential kan det t.ex. bero på övertag av mikrobiella protozoer. Betydelsen av att också utföra PLFA-analyser ökar då markant.

Mikrobiella verktyg kräver ett noga genomtänkt och väl planerat undersökningsförlopp för att få fullt utbyte. Själva provtagningen och hanteringen kräver vidare en erfaren fältpersonal med både platsspecifik kunskap och insikt i provtagningsmetoderna.

Tillsammans med reellt föroreningsinnehåll är dekloreringsgrad (DKG) ett väl ägnat beräknings sätt för att visa föroreningsutvecklingen i ett område, både vid passiv naturlig, och stimulerad, nedbrytning av klorerade etener.

Isotopanalyser (CSIA) kan användas för att ge målriktade data angående nedbrytning. Med informationen kan man skilja ”verklig” nedbrytning från utspädning, gasavgång, m.m. CSIA kräver dock att relevant bakgrundsdata (isotopbaserad) föreligger.

Ovan nämnda provtagnings- och analysmetoder ger mycket betydelsefull information om de föränderliga förhållandena i ett förorenat område. Men även enkla fältanalyser kan ge viktiga underlagsdata. Ett alltför lågt pH kan indikera behov av bufferttillsats, alltför högt redox och signifikant värde på syrehalten kan generera behov en ytterligare tillsats av kolkälla, m.m. Slutlig bedömning kräver dock att resultat av enkla fältmässiga parametrar kopplas till utfall över tid av dyrare analyser som t.ex. qPCR, halter av föroreningar och dess nedbrytningsprodukter och CSIA.

Slutligen är det av vikt vid biostimulering att regelbundet kontrollera metanhalter i grundvattnet. En del av bildat löst metan i grundvattnet kan avgå till gasfas. Metan i luft kan vara explosivt. Om halterna i vattnet överstiger ca 1/3-del av metans mättnadsgrad bör gaskontroll utföras, inte minst om provpunkterna befinner sig inomhus.

Sammantaget är det viktigt att provtagning utförs både före och efter biostimulering (och/eller bioaugmentation) i provpunkter som täcker de olika typområdena (källa och plym). Bakgrundsinformation bör bestå av analyser vid minst två provtillfällen före stimulering/augmentation. Under perioden efter stimulering/augmentation krävs tillräckligt många provtillfällen så att det tydligt går att visa att åtgärdskraven är uppnådda. Detta kräver vanligtvis även kontrollprovtagningar under 1–2 års tid efter att kraven för första gången är nådda. Därtill kan provtagningarna efter stimuleringen visa på behov av nya provtagningspunkter eller extra provtagningsrundor innehållande speciella parametrar (t.ex. för att avgöra om förutsättningarna för god nedbrytning upprätthålls). Frekvens och omfattning är beroende av områdets storlek, komplexitet inklusive typ av jordart (som i sin tur påverkar grundvattenflödet och transport av biostimulerade ämnen), utvecklingen av nedbrytningen samt naturligtvis av ekonomin.

9.3 Platsspecifika rekommendationer

Erfarenheter från föreliggande projekt pekar på behovet av att, innan beslut tas om eventuellt fortsatt användande av komplett avancerad Bio-Trap med tre avgränsade enheter, klargöra huruvida de avgränsande delarna (bafflarna) i denna verkligen klarar av önskad avgränsning, relaterat till typ av grundvattenrör, annan provtagning i röret, m.m.

Som alternativ till att använda komplett avancerad Bio-Trap kan övervägas att endast använda BioStim-enheten (eller ev. BioAug-enheten). Det bedöms möjligt att fastän endast en av de tre enheterna i avancerad Bio-Trap i så fall används så skulle det ändå kunna tillåta en kostnadseffektiv utvärdering av olika typer av kolkällor eller kommersiella bakterieblandningar (beroende på val av enhet). Exempelvis skulle utfallet från enbart BioStim-enhet kunna jämföras med utfallet från standard Bio-Trap i närliggande provpunkter inom ett område med likartat mikrobiellt samhälle. Enbart BioStim-enheten skulle då kunna ge information om t.ex. huruvida det existerande mikrobiella samhället kan ändras att bli mer fördelaktigt om vald kolkälla tillsätts.

Efter biostimuleringen konstaterades *Dehalococcoides* spp. (DHC) i samtliga provtagningspunkter. I en del provpunkter var antalet måttligt–høgt, medan i några andra var det lågt (främst nedströms källområdet). Gensekvenser som kodar för produktion av enzym som bryter ned VC har befunnits vara tillfredställande i en del provpunkter men lågt i andra punkter. Det synes i de flesta fall finnas en koppling mellan mängden av dessa gensekvenser, mängden av DHC (och eventuellt av *Dehalobacter* spp.) samt omfattning av fullständig nedbrytning (dvs. att även VC bryts ned). Denna koppling är av betydelse eftersom genanalyserna är utförda på DNA (ger mikrobiell potential för, men inte reell, nedbrytningsaktivitet).

Generellt behov av bioaugmentation och/eller biostimulering i källområdet bedöms inte vara aktuellt idag. I vissa delområden/punkter i källområdet kan dock behov av bioaugmentation och/eller ytterligare biostimulering uppkomma. Vinsten av att tillsätta mikroorganismer måste vägas samman med platsens specifika förutsättningar och värderas med avseende på uppsatta saneringskrav, bedömd saneringstid och ekonomi.

Resultat i projektet indikerar bl.a. förändringar i plymen till följd av den ökade mikrobiella aktiviteten i det uppströms liggande källområdet efter biostimuleringen. Detta är viktigt att ha med i projektets övervakningsprogram. Om en framtida aktiv sanering krävs i plymen avgörs av föroreningshalter samt avstånd till grannfastigheter och föroreningsfluxen ut från källområdet. Föroreningshalterna i plymen indikerar fortsatt behov av kontrollprovtagning av denna. Om halterna inte minskar tillräckligt inom rimlig tid, i förhållande till uppställda åtgärdskrav, bör åtgärd övervägas. Sådan åtgärd kan innefatta t.ex. biostimuleringen, eventuellt med bioaugmentation, i ett eller flera bälten tvärs över plymen. Vid design av åtgärd är det naturligtvis viktigt att beakta att plymen är påvisad i ett bostadsområde.

Referenser

Nedan hänvisade internetsidor vara alla aktiva för nedladdning senast 31 maj 2013.

Abe Y., Aravena R., Zopfi J., Shouakar-Stash O., Cox E., Roberts J., Hunkeler D., 2009. Carbon and chlorine isotope fractionation during aerobic oxidation and reductive dechlorination of vinyl chloride and *cis*-1,2-dichloroethene. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 43, pp 101-107.

Aeppli C., Hofstetter T., Amaral, H., Kipfer R., Schwarzenbach R., Berg M., 2010. Quantifying *in situ* transformation rates of chlorinated ethenes by combining compound-specific stable isotope analysis, groundwater dating, and carbon isotope mass balances. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 44, pp 3705-3711.

Amex Geomatrix, 2011. Stable carbon, hydrogen and chlorine isotope ratios of dissolved chlorinated ethenes. Environmental forensics in an era of emerging diagnostic methods. Groundwater Resources Association of California. April 12, 2011, Irvine, California.

Bjerg P., Hansen M., Christiansen C., Scheutz C., Broholm M., 2006. Anaerob deklorering og oprensning af lav-permeable aflejringer. Danmarks Tekniske Universitet, DTU. København AMT.
www.sara.env.dtu.dk/upload/institutter/e&r/sites/sara/documents/anaerobdeklar_bjerg2006.pdf

Bloom Y., Aravena R., Hunkeler D., Edwards E., Frape S., 2000. Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, *cis*-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: Implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 34, pp 2768-2772.

Bouchard D., 2007. Use of stable isotope analysis to assess biodegradation of volatile organic compounds in the unsaturated subsurface. PhD thesis. Centre D'Hydrogeologie, Faculte des Sciences, Université de Neuchâtel. Thesis defence date: January 29th 2007. Public presentation date: February 23rd 2007.

Bradley P., 2011. Reinterpreting the importance of oxygen-based biodegradation in chloroethene-contaminated aquifer. *Ground Water Monitoring & Remediation*, Vol. 31, no. 4, pp 50-55.

Bradley P., Chapelle F., 2011. Microbial mineralization of dichloroethene and vinyl chloride under hypoxic conditions. *Ground Water Monitoring & Remediation*, Vol. 31, no. 4, pp 39-49.

Chang Y., Sawada K., Takamizawa K., Kikuchi S., 2012. Biochemical and molecular characterization of a PCE-dechlorinating microorganism. *Enz. Eng.*, Vol. 1, no. 1, pp 2-4.
<http://www.omicsgroup.org/journals/biochemical-and-molecular-characterization-of-a-pce-dechlorinating-microorganism-2329-6674.1000e102.pdf>

Chu K., Mahendra S., Song D., Conrad M., Alvarez L., 2004. Stable carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of chlorinated ethenes. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 38, pp 3126-3130.

Clingenpeel S., Moan J., McGrath D., Hungate B., Watwood M., 2012. Stable carbon isotope fractionation in chlorinated ethene degradation by bacteria expressing three toluene oxygenases. *Front Microbiology*, Vol. 3, Article 63.

ESTCP, 2011. Application of nucleic acid-based tools for monitoring monitored natural attenuation (MNA), biostimulation, and bioaugmentation at chlorinated solvent Sites. Guidance Protocol. ER-0518.
<http://www.clu-in.org/download/techfocus/biochlor/Bio-MNA-ER-200518-Guidance.pdf>

Fennell D., Nijenhuis I., Wilson S., Zinder S., Häggblom M., 2004. *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 7, pp 2075–2081.

Fung J., Morris R., Adrian L., Zinder S., 2007. Expression of reductive dehalogenase genes in *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 growing on tetrachloroethene, trichloroethene, or 2,3-dichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 73, no. 14, pp 4439-4445.

Furukawa K., Suyama A., Tsuboi Y., Futagami T., Goto M., 2005. Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfotobacterium* sp. strain Y51: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol 32, no. 11-12, pp 534-541.

Gonfiantini R., Stichler W., Rozanski K., 1995. Standards and intercomparison materials for stable isotopes of light elements. IAEA-TECDOC-825, Vienna, 13-29.

Griffin B., Tiedje J., Löffler F., 2004. Anaerobic microbial reductive dechlorination of tetra-chloroethene to predominately *trans*-1,2-dichloroethene. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 38, pp 4300-4303.

Hug L., Maphosa F., Leys D., Löffler F., Smidt H., Edwards E., Adrian L., 2013. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for classification system for reductive dehalogenases. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, Vol. 368, no 1616; 20120322.

Isodetect, 2007. Isofrac Datenbank. <http://www.isodetect.de/isofracDB.php>

Isodetect, 2012. Personlig information 2012-10-02 från Isodetect Umweltmonitoring GmbH, Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg.

Karant N., Deo P., Veenanadig N., 2010. Microbial production of biosurfactants and their importance. <http://eprints.iisc.ernet.in/1543/1/currscid.pdf>

Larsson L., 2009. Naturlig självrening av klorerade alifater – Vägledning. Statens geotekniska institut. SGI Varia 601, Linköping. <http://www.swedgeo.se/upload/publikationer/Varia/pdf/SGI-V601.pdf>

Lee P., Johnson D., Holmes V., He J., Alvarez-Cohen L., 2006. Reductive dehalogenase gene expression as a biomarker for physiological activity of *Dehalococcoides* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 72, no. 9, pp 6161-6168.

Lee P., Macbeth T., Sorenson Jr. K., Deeb R., Alvarez-Cohen L., 2008. Quantifying genes and transcripts to assess the *in situ* physiology of “*Dehalococcoides*” spp. in a trichloroethene-contaminated groundwater site. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, no. 9, pp 2728-2739.

Maymo-Gatell X., Chien Y., Gossett J., Zinder S., 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *SCIENCE*, Vol. 276, pp 1568-1578.

Microbial Insights, 2011. How does CENSUS work? <http://www.microbe.com/index.php/CENSUS/how-does-census-work.html>

Microbial Insights, 2012. pH buffering. <http://www.microbe.com/images/stories/pdfs/acidity.pdf>

Microbial Insights, 2013. Microbial remediation. pH Buffering – Overview. Microbial Insights, Inc., USA. <http://www.microbe.com/index.php/pH-Buffering/ph-buffering-overview.html>

MIFO, 2002. MIFO-inventering nr: F1382-0030 år: 2002.

- Nordberg U., 2006. Biogas – Nuläge och framtida potential. Rapport 993. Värmeforsk.
- Pirkle R.J., 2006. Compound Specific Isotope Analysis: The Science, Technology and Selected Examples from the Literature with Application to Fuel Oxygenates and Chlorinated Solvents. Microseeps, Inc. http://www.advancedtools.us/resources/papers/csia/Compound_Specific_Isotope_Analysis.pdf
- Regensis, 2012. 3-D Microemulsion (3DMe)TM. Subsurface transport mechanisms. Techn Bull. 2.0.
- RITS, 2007. Bio – State of practice. CDM North Wind, Inc., NAVFAC, USA.
- Sanket K., Yagnik B., 2013. Current trend and potential for microbial biosurfactants. Review article. Asian J. Exp. Biol. Sci., Vol. 4, no. 1, pp 1-8. [http://www.ajeb.com/vol4\(1\)/1.pdf](http://www.ajeb.com/vol4(1)/1.pdf)
- SGF, 2011. Stimulerad reduktiv deklorering. En praktisk handledning. Svenska Geotekniska Föreningen. Rapport 1:2011.
- Sherwood Lollar B., Slater G., Ahad J., Sleep B., Spivack J., Brennan M., MacKenzie P., 1999. Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: Implications for intrinsic bioremediation. Organic Geochemistry, Vol. 30, no. 8, pp 813–820.
- Slater G., Sherwood Lollar B., Sleep B., Edwards E., 2001. Variability in carbon isotopic fractionation during biodegradation of chlorinated ethenes: Implications for field applications. Environ. Sci. Technol., Vol. 35, no. 5, pp 901–907.
- Smits T., Assal A., Hunkeler D., Holliger C., 2011. Anaerobic degradation of vinyl chloride in aquifer microcosms. J. Environmental Quality, Vol. 40, pp 915-922.
- Spormann A., 2011. Genome-enabled molecular tools for reductive dehalogenation – A shift in paradigm for bioremediation. http://symposium2011.serdpe-estcp.org/content/download/12528/149668/version/2/file/3D_Spormann.pdf
- Sublette K., Davis G., Ogles D., 2010. Applications of Bio-traps. Advanced Tools Webinar –August 13, 2010. Microbial Insights, Inc. and University of Tulsa, USA.
- Sublette K., Davis G., Ogles D., Baldwin B., Biernacki A., 2011. Applications of Bio-traps. Workshop, Oakland, California, USA. Sublette Consulting Inc. http://www.advancedtools.us/downloads/pdf/workshops/Oakland_CA/Module_9_Sublette.pdf
- US EPA, 2005. Monitored natural attenuation of MTBE as a risk management option at leaking underground storage tank sites. EPA 2005/600/R-04/179. US Environmental Protection Agency.
- US EPA, 2008. A guide for assessing biodegradation and source identification of organic ground water contaminants using compound specific isotope analysis (CSIA). EPA 600/R-08/148. US Environmental Protection Agency.
- van der Zaan B., Hannes F., Hoekstra N., Rijnaarts H., de Vos W., Smidt H., Gerritse J., 2010. Correlation of *Dehalococcoides* 16S rRNA and chloroethene-reductive dehalogenase genes with geochemical conditions in chloroethene-contaminated groundwater. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 76, no. 3, pp 843-850.
- Vetbact, 2013. Nomenklatur för bakterier. <http://www.vetbact.org/vetbact/?displayterms=1>

Wrenn B., 2004. Enhanced reductive dechlorination through biological interactions with zero-valent iron. Federal Remediation Technologies Roundtable. FRTR Meeting 9 June 2004.
http://www.frtr.gov/pdf/meetings/j--wrenn_09jun04.pdf

WSP, 2010a. PM Miljöteknisk undersökning, Rampen 36 i Falkenberg – klorerade alifater. Fagerhults belysning AB, 2010-06-30.

WSP, 2010b. Rapport Miljöteknisk undersökning, Rampen 36 i Falkenberg – klorerade alifater. Fagerhults belysning AB, 2010-06-30.

WSP, 2010c. Fagerhults belysning AB. Anmälan om avhjälpandeåtgärd på fastigheten Rampen 36, enligt 28§ i förordningen (1998:899) om miljöfarlig verksamhet och hälsoskydd. 2010-07-20.

WSP, 2012. Rampen 36 – Kontrollprogram för klorerade lösningsmedel. Sammanfattning – provtagningar t.o.m. oktober 2012. Ver. 2012-11-12.

Förklaringar

Nedan ges några förklaringar till återkommande förkortningar och uttryck som används i rapporten.

Bioaugmentation Tillsats av utvalda mikroorganismer med potential att bryta ned förorening

Biostimulering I fallet högklorerade etener motsvarar detta främst tillsats av kolkälla med målsättning att denna fermenteras under bildning av bl.a. väte som i sin tur kan användas mikrobiellt för den reductiva dekloreringen

BioAug Den del av avancerad Bio-Trap som försetts med mikroorganismer och således mäter effekterna av att tillföra mikroorganismer till marken

BioStim Den del av avancerad Bio-Trap som försetts med kolkälla och således mäter effekterna av att tillföra kolkälla till marken

Bio-Trap, standard och avancerad, innefattar passiva provtagare som designats för att undersöka mikrobiell nedbrytning

cis-DCE *cis*-dikloreten, nedbrytningsprodukt till trikloreten

CENSUS Patenterad metod (Microbial Insights) för att med qPCR-analysera specifika mikrobiella gener

CSIA Compound Specific Isotope Analysis

DKG Dekloreringsgrad

ETN I rapporten avses eten, dvs. den icke toxiska nedbrytningsprodukten till VC

Fermentation Bakteriell nedbrytning av organisk kolkälla i frånvaro av syre

In situ På plats, i rapporten används uttrycket exempelvis för att beskriva något som sker i marken istället för att jorden tas upp och saneras ovan mark

Mesocosm Behållare innehållande jord som placeras i grundvatten. Borrning av grundvattenbrunn utförs så att hel, ostörd, jordkärna erhålls från akvifärdelen. Del av denna kärna placeras i permeabel behållare som därefter sänks ned i samma grundvattenbrunn och nivå som jordprovet/delen av jordkärnan togs ut ifrån. Hela processen med upptag, hantering och återinsättande i akvifären kräver syrefria/anaeroba förhållanden om fokus ligger på reductiv deklorerings.

MNA Monitored Natural Attenuation (= Övervakad Naturlig Självrening), naturligt pågående processer övervakas utan tillförsel av vare sig näringsämnen eller mikroorganismer. I samband med Bio-Trap så används uttrycket för att adressera den enskilda provtagaren standard Bio-Trap, eller att adressera mikrobiell del av en kontrollenhet i avancerad Bio-Trap som inte ska påverkas av andra enheter i samma Bio-Trap.

MIP Membrane Interface Probe. Undersökningsutrustning/sond som pressas ned i jord och mäter relativ koncentration av flyktiga organiska ämnen

PLFA Phospholipid fatty acid. Molekylärbioologiskt verktyg som är lipidbaserat. Fettsyror utgör huvudkomponenter i mikroorganismernas cellmembran. Genom att analysera fettsyror (fosfolipider) undersöks

tre nyckelaspekter i det mikrobiella samhället, nämligen levande biomassa, samhällets sammansättning och metabolisk status.

Protozoer (protozoan, protists) är mikroorganismer som kan livnära sig på, äta upp, andra mikroorganismer, t.ex. *Dehalococcoides* (se t.ex. Cunningham J., Kinner N., Lewis M., 2009. Protistan predation affects trichloroethene biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp 7588–7593. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2794109/pdf/1820-09.pdf>).

sp. Förkortning av engelskans "species", i singular. Mikroorganismer delas in i bl.a. olika släkten (engelskans "genus"). Ett exempel är *Dehalococcoides*. Denna släkt består av flera arter (engelskans "species"), t.ex. *Dehalococcoides ethenogenes*. Inom en art kan viss specifik egenskap besittas. Om arten inte är fastställd anges istället sp. Exempelvis *Dehalococcoides* sp. (ospecificerad art av *Dehalococcoides*), i motsats till *Dehalococcoides ethenogenes* (specifik art inom *Dehalococcoides*). Ibland är arten inom ett släkte inte fastställd men man har ändå funnit att vissa inom sådan art (kallas ibland "underart") har en gemensam genetisk likhet som i sin tur kodar för enzym som bryter ned vissa klorerade etener. Exempel på detta är *Dehalococcoides* sp. BAV1, alternativt skrivs ibland *Dehalococcoides* sp. (strain BAV1), där gendelen anges inom parantes i slutet. Ett annat exempel är *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195.

spp. Förkortning av engelskans "species", i plural. Denna ändelse gäller om flera ej fastställda arter, eller delar av flera arter, inom en bakteriesläkt har aktuell egenskap, t.ex. *Dehalococcoides* spp.

TCE Trikloretan, kolväte med dubbelbindning och tre kloratomer, organiskt lösningsmedel

VC Vynylklorid, i rapporten avses nedbrytningsprodukten till cis-DCE

qPCR Quantitative Polymerase Chain Reaction. qPCR-analyser ger resultat avseende mikroorganismer som har en eller flera specifika genssekvenser. Fokuserar på antingen DNA eller RNA.

Bilagor 1-9

1. Teoretisk information om isotopanalyser och beräkningar
2. Bio-Trap – DNA Sampling Protocol (Microbial Insights, Inc.)
3. Bio-Trap – RNA Sampling Protocol (Microbial Insights, Inc.)
4. DHC Interpretation guide (Microbial Insights, Inc.)
5. Phospholipid Fatty Acid Analysis. Interpretation Guidelines (Microbial Insights, Inc.)
6. Analysprotokoll Standard Bio-Trap. Protocol number 028JI (Microbial Insights, Inc.)
7. Supply List – Deployment. Bio-Trap / avancerad Bio-Trap (Microbial Insights, Inc.)
8. Analysprotokoll avancerad Bio-Trap: SITE LOGIC Report Bio-Trap *In Situ* Microcosm Study. Microbial Insights, USA. 029JI Report Revised 11/26/2012
9. Analysprotokoll isotopanalyser, CSIA (Microseeps, Inc.)



Bilaga 1

**Teoretisk information om isotopanalyser
och beräkningar**



Innehållsförteckning

1	Inledning	1
2	Allmänt	1
3	Beräkningssätt	2
4	Underlag till fördjupad beräkning med isotopdata	7
5	Teoretiskt beräkningsexempel	11

1 Inledning

Detta är en bilaga till SGI rapporten ”Potential för bioaugmentation och utökad biostimulering i kloreten förorenat område”. Innehållet i bilagan riktar sig till läsare som önskar få fördjupad information om hur man kan använda, beräkna och utvärdera data från analys av kolisotoper av klorerade etener i en förorenad akvifär.

Biostimulering och/eller bioaugmentation är åtgärder som används vid sanering av akvifärer förorenade med t.ex. kloreter. Information om vad sådana åtgärder innebär ges i huvuddokumentet. Åtgärderna ingår i begreppet förstärkt självrening och effekterna undersöks och kontrolleras på likartat sätt som för vanlig naturlig självrening. Kontrollen har bl.a. som krav att på flertal sätt bevisa att en betydande del av uppkommen haltreduktion av förorening orsakas av nedbrytning. Ett av dessa bevis på nedbrytning kan baseras på dataanalys av kolisotoper av klorerade etener. Andra sätt och verktyg för att klargöra omfattning av nedbrytning av klorerade etener, samt vägledning i nödvändiga undersökningar och kontroller, ges bl.a. i Larsson (2009).

Angivna referenser i denna bilaga hänvisas till referenskapitlet i huvuddokumentet.

2 Allmänt

Som anges i huvudrapporten är föreningsspecifik isotop analys (CSIA, compound specific isotope analysis) en metod som mäter förhållandet av naturligt stabila isotoper i t.ex. föreningar. CSIA kan användas för att få information om bl.a. nedbrytning av föreningar som har dessa naturliga isotoper i sina molekylstrukturer. Analys av isotoper av klorerade etener görs vanligtvis på prover av grundvatten i en förorenad plym. Vid reaktiv deklorering av de klorerade etenerna kommer förhållandet $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ att minska i nedbrytningsprodukten och öka i kvarvarande, icke-nedbruten, förening.

Ett mindre vanligt alternativ är att istället analysera biomassan (mikroorganismernas celler). Detta görs då främst i nedbrytningsstudier på laboratorium och förutsätter att nedbrytningen är sådan att organismen nyttjar kolet i molekylerna till celluppbyggnad. I det fallet gäller att förhållandet $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ minskar i cellerna (d.v.s. ^{12}C ökar i cellerna relativt ^{13}C) ju mer som brutits ned och upptagits för cellbyggnad. För undersökning i fält av reaktiv deklorering används dock CSIA främst på själva molekylerna (föreningen) i t.ex. grundvattnet.

¹ ^{12}C och ^{13}C är båda naturligt förekommande, stabila isotoper av kol. ^{12}C är den mest vanligt förekommande formen.

Orsaken till att fördelningen mellan isotoperna förändras vid nedbrytning är att elektronbindningar till t.ex. en ^{12}C -atom är något lättare att bryta upp än bindningar till en ^{13}C -atom. Den sistnämnda är ”tyngre” än den förra, orsakat av att den har 7 neutroner i sin kärna, jämfört med ^{12}C som har 6 neutroner. Nedbrytning (biotisk och abiotisk²) av förening resulterar härav i att kvarvarande förening med tiden har en övervikt av molekyler med tunga isotoper (medan dess nedbrytningsprodukter får en övervikt av lättare isotoper). Detta kallas ibland fraktionering och har på senare tid fått ökad användning bl.a. vid undersökning av olika nedbrytningsförlopp. Även naturliga, icke-nedbrytande, processer såsom utspädning, sorption och förångning har inverkan på förhållandet $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. I jämförelse med nedbrytningsförlopp har dock dessa processer en begränsad inverkan på fördelningen, inte mer än högst ca 0,5 %.

Sammantaget innebär detta att CSIA kan användas för att bl.a. klargöra om haltminskning beror av nedbrytning samt hur stor andel av denna haltminskning är orsakad av nedbrytning och inte av utspädning, fastläggning, gasavgång etc.

Förslag på rumslig och tidsmässig provtagning (provtagningsfrekvens, omfattning av provtagning, antal punkter och tidsintervall) av CSIA i en förorenad akivfär ges i US EPA (2008).

3 Beräkningsätt

Förutsatt att mikrobiell nedbrytning är det platsspecifikt primära nedbrytnings sättet för klorerade alifater så baseras utfallet av CSIA alltså på att mikroorganismerna under nedbrytningen föredrar att attackera molekylobindningar mellan atomer av typen stabila lätta isotoper (t.ex. ^{12}C , ^1H , ^{35}Cl), i förhållande till stabila tunga isotoper (^{13}C , ^2H , ^{37}Cl). Detta förhållande betecknas δ , och kallas nedan för isotopkvot. Skillnad i fördelning av t.ex. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotoper mellan förening och dess nedbrytningsprodukt indikerar då nedbrytning av förening.

Isotopkvoten (δ) för kolisotoperna ^{13}C och ^{12}C beräknas enligt (US EPA, 2008):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [((^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PROV}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}) / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}] \cdot 1000 \quad (\text{Ekvation 1})$$

$\delta^{13}\text{C}$ (‰) betecknas ibland ”Del (‰)”, t.ex. i rapporter från företaget Microbial Insights som anlitas i föreliggande projekt.

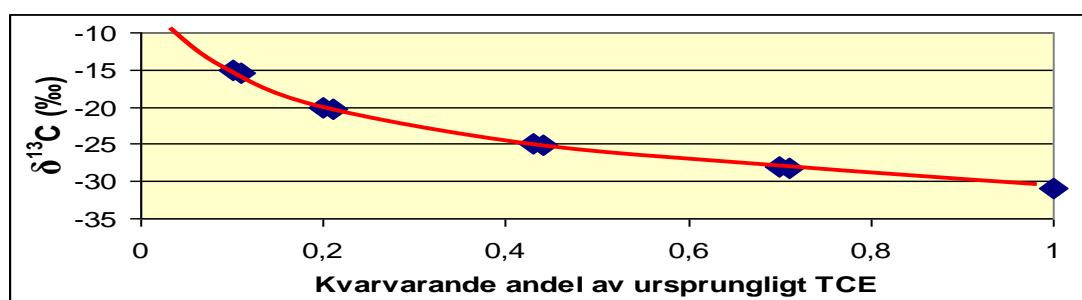
$\delta^{13}\text{C}$ anges i miljondelar och rapporteras i ‰, ibland med tillägget V-PDB (eller VPDB; Vienna Pee Dee Belemnite). Tillägget anger att mätningen gjorts relativt en internationell standard för kolisotoperna. Enligt Pirkle (2006) motsvarar V-PDB standard $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,011180$. Det innebär att om $\delta^{13}\text{C} = +10 \text{‰}$ så motsvarar det $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,011292$, d.v.s. mätningarna kräver detektering av ytterst små variationer. Om tillägget ej anges så kan man idag ändå förmoda/förutsätta att angivna värden är rapporterade relativt det internationellt fastställda isotop standard materialet. Det kan nämnas att vissa internationella laboratorier istället använder VPDB, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,0112372 \pm 29$ som standardvärde (Isodetect, 2012). Detta värde presenterades av Gonfiantini et al. (1995). Det är härav viktigt att använda samma standard vid jämförelse av värden.

Av ovan fås att ju längre som nedbrytningen av en ursprungsförening, t.ex. TCE, har gått desto högre relativt halt av ^{13}C (relativt till ^{12}C) hos kvarvarande TCE-molekyler. Av Ekvation 1 fås att reaktiv dekho-

² Biotisk = baseras på biologiska processer, abiotisk = baseras på andra processer än biologiska.

tering av en förening, t.ex. TCE, resulterar i högre värde (minskat negativt värde) på $\delta^{13}\text{C}$ för kvarvarande TCE. Exempelvis om TCE i en provpunkt har $\delta^{13}\text{C} = -15\%$, jämfört med $\delta^{13}\text{C} = -30\%$ för TCE i en annan provpunkt, så uppvisar den förra punkten (-15%) betydligt längre gången nedbrytning av TCE än den senare. Detta beskrivs principiellt Figur 3.1. Av figuren framgår också att ett typiskt värde på ursprungligt (icke nedbrutet) TCE är $\delta^{13}\text{C} = -31\%$. Detta innebär att i detta fall är förhållandet $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ursprungligt TCE 3,1 % (31/1000) lägre än den i detta fall använda standarden.

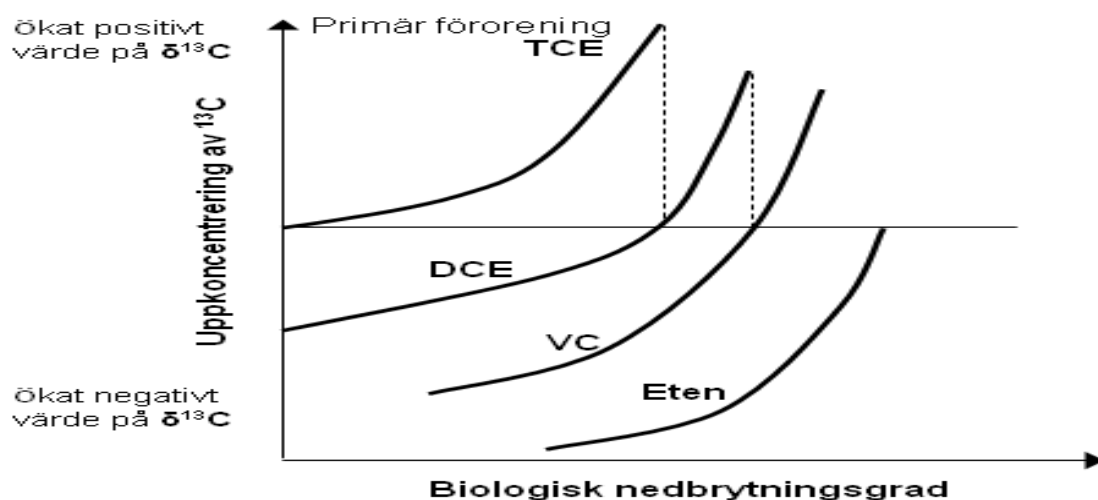
I princip skulle Ekvation 1 vid reduktiv deklorering endast kunna användas för ursprungsförening eftersom nedbrytningsprodukterna både kan bildas och brytas ned, vilket kan göra utfallet för produkterna svårtolkat. Erfaren expert kan dock göra tolkning baserat på enskilda nedbrytningsprodukters isotopkvoter samt på bl.a. den totala nedbrytningen. Principer/underlag ges i Figur 3.2 och Figur 3.3.



Figur 3.1. Principiell beskrivning av förändring av $\delta^{13}\text{C}$ (‰), orsakat av reduktiv deklorering, som funktion av kvarvarande TCE.

I Figur 3.2 fås, förutsatt TCE är ursprungsförening och fullständigt deklorerats till DCE, samtidigt som vi antar att DCE inte dekloreras, att detta DCE kommer att erhålla samma $\delta^{13}\text{C}$ som TCE hade vid starten av dess nedbrytning. Om DCE därefter dekloreras kommer $\delta^{13}\text{C}$ för DCE att övergå till högre värden (värdena åt det mer positiva hållet). Vid fullständig reduktiv deklorering av DCE och ingen deklorering av bildat VC sker så kommer VC att ha samma $\delta^{13}\text{C}$ som TCE hade vid start av dess nedbrytning. Om VC därefter bryts ned kommer VC att uppvisa högre (mer positiva) värden.

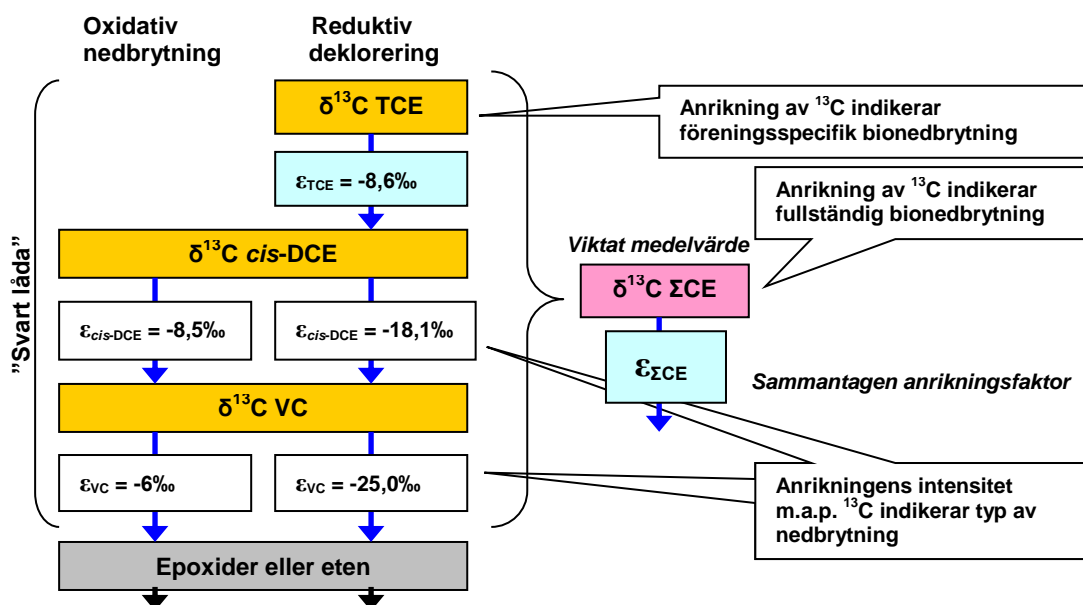
Kvarvarande TCE kommer alltså att uppvisa högre $\delta^{13}\text{C}$ värden (mer och mer åt det positiva hållet) ju längre nedbrytningen av TCE pågår (Figur 3.1). I början av dekloreringen kommer dessutom nedbrytningsprodukterna från DCE och VC ha låga $\delta^{13}\text{C}$ värden (d.v.s. signifikanta minusvärden) och därtill ha lägre värden (mer negativa värden), jämfört med ursprungsföreningen TCE.



Figur 3.2. Principiell utveckling av isotopa signaturer under reduktiv deklorering av TCE som primär förorening.

Ovan gäller reduktiv deklorering. DCE och VC (i viss mån av TCE) kan alternativt brytas ned oxidativt. $\delta^{13}\text{C}$ för oxidativ nedbrytning av DCE och VC kan förväntas ge avsevärt mindre fraktionering än reduktiv deklorering (Chu et al., 2004; Bloom et al., 2000). Clingenpeel et al. (2012) fann att aerob oxidativ nedbrytning av *cis*-DCE resulterade i $\delta^{13}\text{C}$ mellan $-0,9\text{‰} \pm 0,5\text{‰}$ och $-1,2\text{‰} \pm 0,5\text{‰}$. Motsvarande för reduktiv deklorering angavs till mellan $-14,1\text{‰}$ och $-20,4\text{‰}$. Smits et al. (2011) fann att anaerob oxidation av VC, relativt reduktiv deklorering av VC, resulterade i liknande trender.

I Figur 3.3 ges info om att man utifrån isotopanalyser kan uppskatta vilken av processerna reduktiv deklorering eller oxidation som huvudsakligen sker. Isotopanalyser har alltså viss potential att särskilja oxidering och reduktiv deklorering av DCE och VC (dock inte för att särskilja metabola och co-metabola reaktionssätt). Figuren indikerar också att man kan uppskatta $\delta^{13}\text{C}$ för den totala dekloreringen eller oxidationen.



Figur 3.3. Exempel på värden för isotopkvoter och anrikningsfaktorer för några föreningar vid reduktiv deklorering och oxidativ nedbrytning. CE = klorerade etener (princip efter Isodetect, 2012). Observera att oxidativ nedbrytning av cis-DCE går direkt till epoxider (svårighet att beskriva detta förenklat i figuren).

Sammantaget, enligt Isodetect (2012) kan kvalitativ utvärdering av isotopdata ge information för identifiering av källa och/eller kvalitativt bevis för biologisk nedbrytning baserat på att

- ursprungliga isotopkvoter hos föroreningar mestadels har värden som är lägre än -22 ‰. Härav kan isotopkvoter som har värden högre/mer positiva än -20 ‰ anses vara orsakade av biologisk nedbrytning
- skillnad i isotopkvoter $\geq +2$ ‰ mellan två provpunkter längs med grundvattenflödet kan användas som bevis på bionedbrytning, förutsatt påverkan från endast en föroreningskälla eller att eventuell påverkan från en andra källa med högre/mer positiva värden på isotopkvoter kan uteslutas. Mindre skillnader i isotopkvoter $> +1$ ‰ mellan två provpunkter kan tolkas som indikation på bionedbrytning
- isotopkvoter hos ursprungsförening som har lägre/mer negativa värden än isotopkvoter hos samma förening i en källa/hotspot indikerar (> -1 ‰) eller ger bevis på (> -2 ‰) ytterligare en hotspot
- förutsatt att nedbrytning kan uteslutas, så ger skillnader i isotopkvoter $> +1$ ‰ indikation på minst två distinkta källor, eller om skillnader i isotopkvoter $> +2$ ‰ bevis på minst två distinkta källor.

Ovan givna sammanfattning bör i ett avseende ges reservation. De anger att isotopdata kan användas för bevis på biologisk nedbrytning. Information i US EPA (2008) bör beaktas i det att även abiotisk nedbrytning kan ge likartade effekter på fördelning av $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Vanligvis är dock abiotisk nedbrytning underordnad biotisk nedbrytning i de fall man utför förstärkt självrening via tillsats av kolkälla.

Isotopdata kan idag användas för både kvalitativ bestämning och för att få kvantitativ information om nedbrytningen. Tolkning av isotopdata med avsikt att förutsäga kvantitativ omfattning av nedbrytningen över tid (eller rum) utgår från Rayleighs ekvation (US EPA, 2008) som kan omformuleras enligt Ekvation 2.

$$B(\%) = \{1 - [(\delta_x^{13}C + 1000) / (\delta_0^{13}C + 1000)]^{(1000 / \epsilon)}\} \cdot 100 \quad (\text{Ekvation 2})$$

där

$B(\%)$ = substratmängd (ursprungsförening) i procent som blivit nedbrutet vid tiden x .

$\delta_x^{13}C = \delta^{13}C$ (se Ekvation 1) hos substrat vid tiden x (t.ex. nedströms längs grundvattnets flödeslinje).

$\delta_0^{13}C = \delta^{13}C$ (se Ekvation 1) hos substrat vid tiden 0 (t.ex. nedströms längs grundvattnets flödeslinje).

ϵ = anrikningsfaktor för isotop given i ‰ ("stable isotope enrichment factor").

I princip innebär Ekvation 2 att endast tre värden (isotopvärde uppströms och nedströms samt isotop anrikningsfaktor) behövs för att kvantifiera bionedbrytning över tid eller längs grundvattnets flödeslinje i en förorenad plym (det senare kräver bl.a. flödes hastighet, kapitel 5 nedan).

Eftersom anrikningsfaktorn ϵ beskriver det proportionella förhållandet mellan koncentration och isotopvärde för en förening och dess nedbrytningsprocess så kan intensiteten i isotopanrikningen, relativt till minskningen av föreningens koncentration, användas för att spåra om nedbrytning av de lågklorerade etenerna sker reduktivt deklorerande eller oxidativt. Principiellt exempel gavs i Figur 3.3. Observera att värdena är satta enbart för att visa principen, dock är de för DCE och VC satta att ligga nära de ϵ värden som Abe et al. (2009) fann i deras tester.

För att kunna bedöma om klorerade etener genomgår fullständig deklorering kan det viktade medelvärdet av alla klorerade eteners isotopkvoter, $\delta^{13}C_{\Sigma CE}$ (i ‰, kallas även bulkfaktor) användas (Aeppli et al., 2010). Denna bulkfaktor fås genom en isotopbaserad massbalans beräkning (beskrivs närmare med Ekvation 24 och tillhörande text). Man multiplicerar varje enskild klorerad etens molära koncentration (mol/l = vikt i gram/liter/molvikt) med dess respektive $\delta^{13}C$ värde, varefter man räknar fram summan för alla närvarande enskilda klorerade etener. Därefter dividerar man denna summa med den totala molära koncentrationen av alla närvarande klorerade etener. Om värdet på $\delta^{13}C_{\Sigma CE}$ ökar, relativt till $\delta^{13}C$ för ursprungsförening, så indikerar det att de klorerade etenerna genomgår fullständig nedbrytning. Genom att därtill använda en sammantagen isotop anrikningsfaktor, $\epsilon_{\Sigma CE}$, kan den totala nedbrytningsprocessen kvantifieras (Isodetect, 2012). Aeppli et al. (2010) ger beskrivning av hur $\epsilon_{\Sigma CE}$ kan beräknas.

4 Underlag till fördjupad beräkning med isotopdata

Utgå från Ekvation 3, Ekvation 5 och Rayleighs ekvation (Ekvation 4) nedan:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [((^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PROV}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}) / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{STANDARD}}] \cdot 1000 \quad (\text{Ekvation 3})$$

$$\mathbf{R}_t = \mathbf{R}_0 \cdot f^{(\alpha-1)} \quad (\text{Ekvation 4})$$

$$f = C_t / C_0 \quad (\text{Ekvation 5})$$

där

C_0 = startkoncentration vid tiden 0 i punkt A

C_t = koncentration av förening vid tiden t i punkt A eller efter transporttiden från punkt A till punkt B där punkt B ligger nedströms punkt A längs grundvattnets flödeslinje. Det sistnämnda kan kopplas till provtagning i B vid samma tidpunkt som provtagning i A men transporttiden mellan A och B krävs då (beskrivs nedan, t.ex. Ekvation 20). Ekvation 4 kan även skrivas som:

$$\ln(\mathbf{R}_t / \mathbf{R}_0) = (\alpha - 1) \cdot \ln(C_t / C_0) \quad (\text{Bouchard, 2007}).$$

$$\delta^{13}\text{C}_0 = \delta^{13}\text{C} (\text{‰}) \text{ hos substrat vid tiden 0}$$

$$\delta^{13}\text{C}_t = \delta^{13}\text{C} (\text{‰}) \text{ hos substrat vid tiden } t$$

$$\mathbf{R}_t = \delta^{13}\text{C}_t + 1000 \text{ (isotopkvot vid tiden } t)$$

$$\mathbf{R}_0 = \delta^{13}\text{C}_0 + 1000 \text{ (isotopkvot vid tiden 0)}$$

α = isotop fraktioneringsfaktor som är detsamma som:

$$\alpha = \mathbf{R}_0 / \mathbf{R}_t = (\delta^{13}\text{C}_0 + 1000) / (\delta^{13}\text{C}_t + 1000) \quad (\text{Ekvation 6})$$

Förhållandet mellan en isotop fraktioneringsfaktor och motsvarande anrikningsfaktor ges av:

$$\boldsymbol{\varepsilon} = (\alpha - 1) \cdot 1000 \quad (\text{Ekvation 7})$$

där

$\boldsymbol{\varepsilon}$ = isotop anrikningsfaktor given i ‰ ("stable isotope enrichment factor"). Värdet är platsspecifikt och kan fås från labstudier på platsspecifikt material. Alternativt kan litteraturvärden användas. I Isodetect (2007) och i US EPA (2008) ges sådana tabellerade värden kopplade till olika nedbrytningsförhållanden och aktiva mikroorganismer. I tabell 4.1 och tabell 4.2 ges några exempel på vad man angett platsspecifikt i litteraturen. Notera att värdet på anrikningsfaktorn ökar för varje reduktivt nedbrytningssteg.

Som framgår av tabell 4.1 och tabell 4.2 kan det platsspecifika värdet på $\boldsymbol{\varepsilon}$ variera kraftigt. I US EPA (2008) ges tabellerade värden på $\boldsymbol{\varepsilon}$ och på $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ relaterade till typ av nedbrytnings sätt och aktiva mikroorganismer för alla klorerade etener.

Tabell 4.1. Exempel på platsspecifikt erhållna värden på den isotopa anrikningsfaktorn ϵ (data från Pirkle, 2006, inklusive referenser). Skillnaderna har föreslagits avspeglade olika platsspecifika mikrobiella kulturer med varierande nedbrytningsegenskaper.

Platsspecifikt erhållna värden på den isotopa anrikningsfaktorn ϵ (‰)				
PCE	TCE	c-DCE	VC	Referens
-	-7,1	-	-	Lollar et al. (1999)
-	-4,6	-15,1	-24,1	Bloom et al., (2000)
-5,5	-13,8	-20,4	-22,4	Slater et al., (2001)

Tabell 4.2. Intervall av α och ϵ för TCE, cis-DCE och VC (US EPA, 2008).

Förening	Intervall av fraktioneringsfaktor α	Intervall av isotop anrikningsfaktor ϵ (‰)
TCE	0,9771 – 0,9975	-2,5 till -22,9
cis-DCE	0,9789 – 0,9859	-14,1 till - 21,1
VC	0,9689 – 0,9785	-21,5 till - 31,1

Ekvation 5 kan skrivas om som (där \wedge betyder ”upphöjt till”):

$$f = (R_t / R_0)^{1 / (\alpha - 1)} = [(\delta^{13}C_t + 1000) / (\delta^{13}C_0 + 1000)]^{\epsilon / (\alpha - 1)} \quad (\text{Ekvation 8})$$

Förutsätt att nedbrytning av förening förlöper enligt första ordningens nedbrytningsförlopp, d.v.s.:

$$f = C_t / C_0 = \exp(-\lambda \cdot t) \quad (\text{Ekvation 9})$$

där

$$-\lambda \cdot t = \ln(C_t / C_0) = \ln f$$

λ = första ordningens nedbrytningskonstant och representerar biotisk och/eller abiotisk nedbrytning. Denna tidsbaserade konstant, som är platsspecifikt, kan beräknas genom isotopmätningar över tid i ett och samma grundvattenrör (alternativt kan rumsbaserad nedbrytningskonstant beräknas), se Ekvation 19 – Ekvation 22.

Om haltreduktionerna beror av en enskild process (t.ex. enbart nedbrytning) och denna process har karakteristisk isotop anrikningsfaktor ϵ (Ekvation 7) så kan värdet på f i Ekvation 9 fås ur Ekvation 8. I sådana fall ska C_t i Ekvation 9 ge en god överensstämmelse med analyserad halt vid tiden t . Emellertid, om beräknad och analyserad halt C_t inte överensstämmer så är det möjligt att andra processer under tiden t i aktuell punkt (eller längs med flödeslinjen mellan två punkter om haltskillnaderna gäller mellan två punkter vid samma tid; beskrivs under givet beräkningsexempel nedan), som inte har att göra med den enskilda processen (t.ex. nedbrytning), påverkar halterna. Sådana processer kan vara utspädning, dispersion, etc. och de har då betydande inverkan på haltförändringarna över tid (eller mellan punkterna). Det är också teoretiskt möjligt att andra processer är aktiva som på något sätt bryter ned förorening (hypotetiskt t.ex. kemiska katalytiska reaktioner) utan att vara beroende av de olika bindningsstyrkorna till ^{13}C och ^{12}C (US EPA, 2008).

Ekvation 5 kan omvandlas enligt:

$$\ln(\mathbf{R}_t/\mathbf{R}_0) = (\alpha - 1) \cdot \ln f = (\varepsilon/1000) \cdot \ln f \quad (\text{Ekvation 10})$$

Ekvation 10, Ekvation 9 och Ekvation 6 ger:

$$(\ln(\mathbf{R}_t/\mathbf{R}_0)) / (\alpha - 1) = \ln f = -\lambda \cdot t$$

$$\lambda = -(\ln(\mathbf{R}_t/\mathbf{R}_0)) / (\alpha - 1) / t$$

$$\lambda = -[(1000 / \varepsilon) / t] \cdot \ln[(\delta^{13}\mathbf{C}_t + 1000)/(\delta^{13}\mathbf{C}_0 + 1000)] \quad (\text{Ekvation 11})$$

Ekvation 11 kan skrivas som:

$$\lambda = -[(1000 / \varepsilon) / t] \cdot \ln[(10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_t + 1)/(10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_0 + 1)] \quad (\text{Ekvation 12})$$

Eftersom $\ln(A/B) = \ln A - \ln B$ fås att Ekvation 12 kan skrivas om som:

$$\lambda = -[1000 / (\varepsilon \cdot t)] \cdot [(\ln(10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_t + 1) - \ln(10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_0 + 1))] \quad (\text{Ekvation 13})$$

Vanligtvis ligger värdet av $\delta^{13}\text{C}$ (‰) i intervallet -20 till +20 vilket gör att $\ln(10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_t + 1)$ kan approximeras med $10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_t$. Detta eftersom $\ln(A+1) \approx A$ i de fall A (d.v.s. här $10^{-3} \cdot \delta^{13}\mathbf{C}_t$) är mycket mindre än 1 (i detta fall är $A = +/-0,02$). Ett större intervall på $\delta^{13}\text{C}$ (‰) motsvarande upp till +/-30 (d.v.s. $A = +/-0,03$), innebär att $\ln(A+1)$ grovt kan approximeras till A, eftersom $\ln(0,03+1) = 0,0296$ och $\ln(-0,03+1) = 0,0305$, varvid fås följande ekvation (med stöd från Pirkle, 2006):

$$\lambda = [1 / (\varepsilon \cdot t)] \cdot (\delta^{13}\mathbf{C}_0 - \delta^{13}\mathbf{C}_t) \quad (\text{Ekvation 14})$$

Ekvation 14 kan omformuleras som:

$$-\lambda \cdot \varepsilon \cdot t = \delta^{13}\mathbf{C}_t - \delta^{13}\mathbf{C}_0$$

d.v.s.

$$\delta^{13}\mathbf{C}_t = -\lambda \cdot \varepsilon \cdot t + \delta^{13}\mathbf{C}_0 \quad (\text{Ekvation 15})$$

Ekvation 15 är räta linjens ekvation ($y = kx + l$) där x är variabeln t i Ekvation 15, konstanten k motsvarar $-\lambda \cdot \varepsilon$ och l motsvarar $\delta^{13}\mathbf{C}_0$.

Eftersom $-\lambda \cdot \varepsilon$ är en funktion av \mathbf{C}_0 och \mathbf{C}_t enligt Ekvation 7, kan Ekvation 15 skrivas som:

$$f = \mathbf{C}_t/\mathbf{C}_0 = \exp [(\delta^{13}\mathbf{C}_t - \delta^{13}\mathbf{C}_0) / \varepsilon] \quad (\text{Ekvation 16})$$

d.v.s.

$$\varepsilon = (\delta^{13}\mathbf{C}_t - \delta^{13}\mathbf{C}_0) / \ln f$$

\mathbf{C}_0 motsvarar vanligtvis högsta halten i källan. För $\delta^{13}\mathbf{C}_0$ gäller då det mest negativa värdet för aktuell förening i källan som uppmätts platsspecifikt. Om ännu mer negativt värde detekterats nedströms källan bör detta senare värde istället användas.

I Ekvation 16 motsvarar f den kvarvarande föreningen. Om man istället vill räkna ut nedbruten förening används $1 - f$. Detta brukar betecknas B och anges i %. $B(\%)$ är alltså substratmängd (ursprungsförening) i procent som blivit nedbrutet vid tiden t (baserat antingen på tid mellan två provtillfällen eller på transporttid mellan provpunkt i plym och i källan, provtagna vid samma tillfälle).

$$B(\%) = (1 - f) \cdot 100 = (1 - \exp [(\delta^{13}C_t - \delta^{13}C_0) / \epsilon]) \cdot 100 \quad (\text{Ekvation 17})$$

B anges ibland alternativt kopplat till Ekvation 8 samt med $\delta_x^{13}C$ och $\delta_0^{13}C$ vilka är desamma som ovan angivna $\delta^{13}C_t$ och $\delta^{13}C_0$:

$$B(\%) = \{1 - [(\delta_x^{13}C + 1000) / (\delta_0^{13}C + 1000)] \wedge (1000 / \epsilon)\} \cdot 100 \quad (\text{Ekvation 18})$$

Enligt US EPA (2005) och Pirkle (2006) kan nedbrytningskonstanten, λ , baseras på antingen tid (med enheten tid^{-1}) eller avstånd (rumsberoende med enhet längd^{-1}). Ekvation 9 ger för tidsberoende nedbrytningskonstant:

$$\lambda_t = - \ln (C_t / C_0) / t \quad (\text{Ekvation 19})$$

där

λ_t = tidsberoende nedbrytningskonstant

$$t = d / v$$

d = avståndet mellan två provpunkter.

v = grundvattenflödet mellan dessa två provpunkter (= hydraulisk konduktivitet • gradient / effektiv porositet).

Det kan noteras att Ekvation 19 är detsamma som:

$$\lambda_t = - [1 / (\epsilon \cdot d / v)] \cdot (\delta^{13}C_t - \delta^{13}C_0) \quad (\text{Ekvation 20})$$

I det fall man istället vill ha rumsberoende nedbrytningskonstant:

$$\lambda_d = - \ln (C_t / C_0) / d \quad (\text{Ekvation 21})$$

där

λ_d = rumsberoende nedbrytningskonstant

d = avståndet mellan de två provpunkter mellan vilka λ_d gäller.

Det kan noteras att Ekvation 21 är detsamma som:

$$\lambda_d = - [1 / (\epsilon \cdot d)] \cdot (\delta^{13}C_t - \delta^{13}C_0) \quad (\text{Ekvation 22})$$

Värdet på denna rumsberoende nedbrytningskonstant är konservativt eftersom det endast baseras på nedbrytning avspeglad med isotopförändringar (tar alltså inte hänsyn till utspädning eller dispersion mellan de två provpunkterna).

Som angetts ovan förutsätts att nedbrytningen över tid i enskild provpunkt går enligt första ordningens nedbrytningsförlopp. Observera att den rumsberoende nedbrytningskonstanten (Ekvation 21 och Ekvation 22) förutsätts kunna baseras på att första ordningens nedbrytningsförlopp också gäller i flödesvägen nedströms enskild punkt.

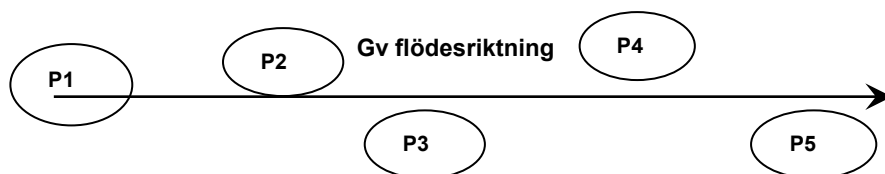
5 Teoretiskt beräkningsexempel

Beräkning av totala reduktionskonstanter baseras på haltförändringar över tid. Dessa förändringar är påverkade av både nedbrytning och icke-nedbrytande faktorer. Konstanterna kan i sin tur användas för enklare prognos av omfattning av framtida totala haltreduktion (Larsson, 2009).

En viktig del i undersökningar av naturlig och förstärkt självrening är att bedöma själva nedbrytningen som sådan. Konstanter baserade på isotopvärden ger den del av totala reduktionen som orsakas av enbart nedbrytning, och inte därtill utspädning, fastläggning, förångning etc. som inkluderas i total reduktionskonstant. Dessa icke-nedbrytande processer orsakar också att halterna minskar men eftersom de inte påverkar, eller enbart mycket lite påverkar, isotopkvoter så ger beräkning av andel nedbruten förorening ($1-f$) i Ekvation 17 och Ekvation 23), baserat på isotopkvoter, konservativa värden avseende förändring av halter i en akvifär (haltreduktionen är alltså i realiteten vanligtvis högre än beräknat utifrån isotopanalyser) (Pirkle, 2006).

För att tydliggöra det teoretiska resonemang som beskrivits i tidigare avsnitt ges här teoretiskt beräkningsexempel. Exemplet har givits extrema teoretiska utgångsdata för att peka på att nedbrytning i en akvifär sällan är homogen i tid och rum och hur man kan finna detta med t.ex. isotopdata. Man bör alltså inte a priori förutsätta homogenitet (t.ex. mikrobiell) eftersom det annars kan ge stor osäkerhet i prognoser.

Antag att provtagning utfördes vid två tillfällen i fem punkter längs med grundvattnets flödesriktning. Provpunktspacering antas vara följande, där P1 är belägen i hotspot.



Förutsätt att TCE är ursprungsförening som bryts ned (här reductivt) och att man önskar få information om nedbrytningens omfattning mellan två punkter, dels rumslig i meter, dels tidsmässig per år.

Antag att i detta exempel gäller att $\epsilon = -12\%$ och att $\delta^{13}\text{C}_0 = -27,4 \text{ ‰}$ (lägsta värde för ursprungsförening uppmätt historiskt i området). Den isotopa anrikningsfaktorn ϵ erhålls vanligtvis från labstudier på platsspecifikt material eller i ovan angivna tabellverk (alternativt, Amex Geomatrix, 2011, anger att Ekvation 16 under vissa förutsättningar kan användas för att uppskatta ϵ , där f ansätts motsvara molhalt av TCE dividerat med summan av molhalterna av TCE, *cis*-DCE och VC).

I tabell 5.1 ges teoretiska förutsättningar (uppmätta halter av DCE och TCE, beräknat haltförhållande för dessa samt $\delta^{13}\text{C}$ (TCE)) och utfall (C_t/C_0 beräknat med Ekvation 16).

För exempelvis punkten P1 fås att:

$$C_t/C_0 = \exp((-23,88 - (-27,4)) / -12) = 0,75.$$

Tabell 5.1. Teoretiskt ansatta förutsättningar samt exemplifierad beräkning av C_t/C_0 .

Provpkt	Datum	DCE µg/l	TCE µg/l	$\delta^{13}\text{C}$ (TCE)	C_t/C_0 Not1	DCE/TCE
P1	2008-06-01	2400	2200	-23.88	0.75	1.1
P1	2009-06-01	8200	2800	-21.58	0.62	2.9
P2	2008-06-01	1000	240	-19.33	0.510	4.2
P2	2009-06-01	1500	121	-15.00	0.356	12.4
P3	2008-06-01	1000	890	-18.11	0.461	1.1
P3	2009-06-01	1000	420	-15.10	0.359	2.4
P4	2008-06-01	900	700	-26.30	0.912	1.3
P4	2009-06-01	120	110	-26.20	0.905	1.1
P5	2008-06-01	22	76	-24.10	0.760	0.3
P5	2009-06-01	78	100	-25.92	0.884	0.8

Not 1: Exempelräkning, se text. Observera att detta förhållande inte baseras på reella halter utan istället framräknade med isotopvärden, Ekvation 16.

Av tabell 5.1 framgår att för punkt P1 så har C_t/C_0 , d.v.s. andel kvarvarande förening baserat på isotopmätningar, från år 2008 till år 2009, minskat från 0,75 till 0,62. Samtidigt har kvoten av uppmätta föroreningshalter, DCE/TCE, ökat nästan 3 gånger. Detta är sammantaget ett bra tecken på att nedbrytning är orsaken till produktionen av DCE, fastän halterna generellt har ökat i punkten. Likartat utfall och bedömning kan göras för punkterna P2 och P3. Men för punkterna P4 och P5 finns inga isotopa bevis på nedbrytning av TCE (eftersom värdena på $\delta^{13}\text{C}$ för båda är så låga att de kan bedömas motsvara att TCE inte utsatts för nedbrytning). För punkten P4 är detta speciellt intressant eftersom halten av TCE synes ha minskat (vilket utan isotopdata skulle kunnat ha tolkats som eventuell nedbrytning). Detta visar styrkan i att utnyttja isotopundersökningar eftersom man med isotopdata har möjligheter att styrka huruvida DCE/TCE förändringen beror på nedbrytning eller inte. Om man erhåller indikation på nedbrytning kan motsvarande nedbrytningskonstanter räknas fram.

För att ta fram tidsberoende och/eller rumsberoende nedbrytningskonstanter, i det här fallet baserat på isotopvärden, kan Ekvation 19 (eller Ekvation 20) respektive Ekvation 21 (eller Ekvation 22) användas.

I tabell 5.2 ges exempel på beräkning (baserat på avsnitt 6.3 i US EPA, 2005) av nedbrytningskonstanter med följande exemplifierade indata (denna enkla beräkning baseras på att isotopvärden inte påverkas av utspädning etc.). Observera att det teoretiska underlaget är från nämnda referens men värdena nedan är ändrade (jämfört med i referensen) för att peka på att lokal nedbrytning kan variera avsevärt från en punkt till en annan i en kloreten förorenad akvifär och hur man kan få indikation på sådan variation:

Hydraulisk konduktivitet: 11 m/dygn

Hydraulisk gradient: 0,0023 m/m

Effektiv porositet: 0,25

Vilket ger att grundvattnets flödes hastighet (seepage velocity) är:

$$11 \cdot 365 \cdot 0,0023 / 0,25 = 36,9 \text{ m / år.}$$

Förenklat antas flödet gälla i alla tre provpunkter i tabell 5.2. Storleken på siffrorna i tabell 5.1 och tabell 5.2 är alltså inte relaterade till någon verklig situation utan är valda delvis för att visa beräkningsgången.

Tabell 5.2. Teoretiska förutsättningar samt exemplifierad beräkning av λ_t och λ_d , baserade på isotopvärden.

Provpkt	C_t/C_0 ¹⁾	Gv-flöde, m/år	Avstånd till punkt P ₁ , m	t, år	λ_t , år ⁻¹	λ_d , m ⁻¹
P2	0,356	36,9	11,7	0,317	3,26	0,088
P3	0,359	36,9	22	0,596	1,72	0,047
P4	0,905	36,9	40	1,084	0,092	0,0025

1) Från tabell 5.1. Förhållandet baseras ej på reella halter utan på isotopvärden.

Nedbrytningskonstanterna i tabell 5.2, som är baserade på isotopvärden (ej reella, endast exempel), kan nu användas för att uppskatta antingen hur långt nedströms som halter, påverkade av enbart nedbrytning, skulle kunna föreligga eller hur lång tid det kommer att ta till vissa halter nås, baserat på enbart nedbrytning. Med insättande i Ekvation 9 av konstanter och halter kan prognos av tid eller avstånd göras enligt följande.

Antag att platsspecifikt föreslaget åtgärds mål, baserat enbart på nedbrytning av TCE, är 20 µg/l av TCE och dess halt i P2 idag är 121 µg/l. Åtgärds mål som baseras enbart på nedbrytning (och inte därtill av andra faktorer som minskar halterna) kan tyckas vara irrelevant, men enligt US EPA (2005) kan myndigheter i USA kräva dessa data för att få en konservativ uppfattning av avstånd nedströms där, och tider tills, platsspecifika åtgärds mål nås. Ekvation 21 ger:

$d = -\ln(20/121)/0,088 = 20$ m, d.v.s. åtgärds målet föreligger idag 20 meter nedströms P2, baserat på data från P2 och P1 (förutsatt att omfattningen av nedbrytningen är lika hela vägen mellan P1 till P2 samt mellan P2 och 21 meter nedströms P2).

Om man istället utgår från P3 (data från tabell 5.1 och tabell 5.2) fås:

$d = -\ln(20/420)/0,047 = 65$ m, d.v.s. åtgärds målet föreligger 65 m nedströms P3 (förutsatt att omfattningen av nedbrytningen är lika hela vägen mellan P1 till P3 samt ned till 65 m nedströms P3). Detta fastän P3 är placerad i en någorlunda rak linje nedströms P2.

Detta teoretiska exempel visar alltså att om värdena skulle föreligga i verkligheten så går det inte att bedöma var åtgärds målet nås utifrån endast en provpunkt. Därtill, som nämnts tidigare, kan det anses konservativt att basera en prognos avseende haltförändringar över tid enbart på nedbrytning, förutsatt att haltreduktion även beror på utspädning, fastläggning etc. Beräkningarna ger emellertid, förutom konservativt utfall, tydlig information om hur den biologiska nedbrytningen varierar rumsligt och/eller tidmässigt. Än tydligare blir detta om man använder data från P4 (data från tabell 5.1 och tabell 5.2):

$d = -\ln(20/110)/0,0025 = 680$ m, d.v.s. åtgärds målet föreligger 680 m nedströms P4.

Värdet för P4, jämfört med värdena för P2 och P3, samt i beaktande att P4 befinner sig nedströms både P3 och P2, ligger i linje med ovan gjorda bedömning att nedbrytningen i P4 är avsevärt lägre än i P2 och P3. Detta kan bero på platsspecifika faktorer (pH, redox, lokalt höga tungmetallhalter som motverkar mikrobiell aktivitet, predatorer d.v.s. mikroorganismer som livnär sig på att äta deklorerande bakterier, i P3 och än mer i P4, grundvattenflödet är inte samma i de olika punkterna, etc.) som påverkar nedbrytningen eller beräknad nedbrytning. Detta bör kunna verifieras med motsvarande mätdata (hydrologiska, geokemiska, mikrobiella) som parallellt bör undersökas i provpunkterna.

Om även P1 – P3 värdena beaktas, samt om grundvattenflödet verkligen är samma i punkterna (som teoretiskt ansatts i tabell 5.2), så kan värdena tolkas så att negativ påverkan på nedbrytningen av TCE i viss

mån startar redan i/nedströms P3 och bli mer utvecklad i/nedströms P4. Detta kan också visas genom att beräkna tiden det kommer att ta i varje punkt för att nå åtgärds målet 20 µg/l, enligt följande.

Med Ekvation 19 fås att det kommer att ta (tiderna är baserade enbart på ett mättillfälle):

$$t = -\ln(20/121)/3,26 = 0,6 \text{ år innan halten i P2 når ned till } 20 \text{ µg/l.}$$

$$t = -\ln(20/420)/1,72 = 1,8 \text{ år innan halten i P3 når ned till } 20 \text{ µg/l.}$$

$$t = -\ln(20/110)/0,092 = 19 \text{ år innan halten i P4 når ned till } 20 \text{ µg/l.}$$

Exempelberäkningen ovan fokuserar på nedbrytning av TCE (kvarvarande eller nedbrutet). Figur 3.3 indikerar bl.a. att också ett värde på den totala nedbrytningen av klorerade etener kan beräknas, förutsatt att man kan få fram ett viktat medelvärde för $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ (där CE betyder klorerade etener) samt värde på sammantagen anrikningsfaktor, $\epsilon_{\Sigma\text{CE}}$.

För att bedöma huruvida alla klorerade etener håller på att brytas ned (eller fullständigt brutits ned) kan det viktade medelvärdet av isotopkvoter för bulken av klorerade etener användas, $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ (Aeppli et al., 2010), enligt Ekvation 23.

$$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} (\%) = [\Sigma(\delta^{13}\text{C}_i \cdot \text{C}_i / \text{M}_i)] / [\Sigma(\text{C}_i / \text{M}_i)] \quad (\text{Ekvation 23})$$

där

$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ = isotopkvot för bulken av aktuella klorerade etener

$\delta^{13}\text{C}_i$ = isotopkvot för den klorerade etenen i

C_i = koncentrationen (µg/l) av klorerade etenen i

M_i = Molvikten (µg/µmol) för den klorerade etenen i

Σ = motsvarar här summan för alla aktuella klorerade etener.

Exempelvis, antag att ursprungsförening är TCE och att $\delta^{13}\text{C}$ för TCE, *cis*-DCE och VC i en provpunkt är -20‰, -25‰ respektive -30‰, samt att halterna för TCE, *cis*-DCE och VC är 700 µg/l, 100 µg/l respektive 10 µg/l. Vi får då:

$$\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}} (\%) = (-20 \cdot 700 / 131,38 + -25 \cdot 100 / 96,94 + -30 \cdot 10 / 62,50) / (700 / 131,38 + 100 / 96,94 + 10 / 62,50) = -21,0 \text{ ‰.}$$

Om detta värde är avsevärt mer positivt än det $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ värde som gäller vid samma tidpunkt uppströms denna mätpunkt, kan detta vara en indikation på att en del TCE har fullständigt deklorerats. Om $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ var t.ex. -26 ‰ i hotspot så bör -21,0 ‰ i den ovan beräknade punkten vara en indikation på fullständig deklorerings (d.v.s. att VC, som bildats från ursprunglig TCE, till icke försumbar del brutits ned). Denna indikation gäller, enligt Aeppli et al. (2010), främst för steady state plymer. De anger att då signifikant sorption av klorerade etener föreligger till akvifärens fasta material, kan skillnader i advektiva flöden för enskilda klorerade etener lokalt i fronten av en icke steady state plym göra att värdet på $\delta^{13}\text{C}_{\Sigma\text{CE}}$ kan variera lokalt. Detta kan alltså bortses ifrån för steady state plymer (vilket antas föreligga i det aktuella exemplet).

För beräkning av $\epsilon_{\Sigma\text{CE}}$ (Figur 3.3) samt av totala nedbrytningskonstanter (som sammantaget i sin tur kan användas för beräkning av total nedbrytningstid) hänvisas till beskrivning av Aeppli et al. (2010).

Bilaga 2

Bio-Trap – DNA Sampling Protocol



SAMPLING INSTRUCTIONS

Storage:

It is important to minimize the amount of time that Bio-Trap Samplers are stored prior to being installed in the field. The physical properties of the Bio-Trap Samplers that make them an ideal medium for collecting microbes also increase the chances of microbial or chemical contamination. Bio-Trap Samplers need to remain sealed and refrigerated (not frozen) until they can be installed in the field.

Note: Clean latex gloves (or similar) should be used at all times when handling Bio-Trap Samplers.

Installation:

- Prior to installing the Bio-Trap Sampler, the monitoring well may need to be purged if it has not been sampled in a while. If purging is necessary, MI recommends that three well volumes be removed to ensure contact with formation water and reduce well bore effect.
- Attach the Bio-Trap Sampler's nylon loop (provided) to a nylon line (not provided) and suspend the Bio-Trap Sampler at a depth where significant contaminant concentrations exist. If no data is available on the vertical distribution of contaminants, then suspend the Bio-Trap Sampler in the middle of the saturated screened interval.
- If large fluctuations in the water level are anticipated during the period of incubation, the Bio-Trap Sampler should be suspended from a float (contact MI for further details). Be sure not to suspend the Bio-Trap in the NAPL zone.
- Once installed, incubation times can vary depending upon the scope of the project (routine monitoring and stable isotope probing (SIP) - 30 days and "baited" - 60 days).

Retrieval:

- Open the monitoring well and pull up the Bio-Trap Sampler. Cut and remove the braided nylon line used to suspend the Bio-Trap Sampler.
- Transfer the recovered Bio-Trap Sampler to labeled (well number and date) zippered bags, seal and then double bag in a larger (one-gallon) zippered bag, immediately place on blue ice in a cooler.
- Repeat the above for all Bio-Trap Samplers from the site. Individual zippered bags containing the Bio-Trap Samplers can be placed in the same one-gallon zippered bag (if there is enough space).
- A chain of custody (COC) form must be included with each shipment of samples.

Hold time for this analysis is 24-48 hours.

SHIPPING INSTRUCTIONS

Packaging Samples:

1. Samples should be shipped in a cooler with ice or blue ice for next day delivery. If regular ice is used, the ice should be double bagged.
2. A chain of custody form must be included with each shipment of samples. Access our chain of custody at www.microbe.com.

Shipment for Weekday Delivery:

Samples for weekday delivery should be shipped to: Sample Custodian
Microbial Insights, Inc.
10515 Research Drive
Knoxville, TN 37932
(865) 573-8188

Shipment for Saturday Delivery:

Coolers to be delivered on Saturday must be sent to our **FedEx Drop Location**. To ensure proper handling the following steps must be taken:

1. FedEx shipping label should be marked under (6) Special Handling, check Hold Saturday.
2. The cooler must be taped with FedEx SATURDAY tape.
3. The shipping label must be filled out with the Drop Location address below. Our laboratory name must be on the address label.
4. You **MUST notify by email customerservice@microbe.com** with the **tracking number** of the package on Friday (prior to 4pm Eastern Time) to arrange for Saturday pickup. Please make sure you write "Saturday Delivery" in the subject line of the message. **Without proper labeling and the tracking number, there is no guarantee that the samples will be collected.**

Samples for **Saturday delivery** should be shipped to: Microbial Insights, Inc.
FedEx Drop Location
10601 Murdock Drive
Knoxville, TN 37932
(865) 300-8053

Note: Samples received for Saturday Delivery will be frozen immediately upon receipt by Microbial Insights staff to minimize changes in the microbial community.

Bilaga 3

Bio-Trap – RNA Sampling Protocol



SAMPLING INSTRUCTIONS

Storage:

It is important to minimize the amount of time that the Bio-Trap Samplers are stored prior to being installed in the field. The physical properties of the Bio-Trap Samplers that make them an ideal medium for collecting microbes also increase the chances of microbial or chemical contamination. The Bio-Trap Samplers need to remain sealed and refrigerated (not frozen) until they can be installed in the field.

Note: Clean latex gloves (or similar) should be used at all times when handling the Bio-Trap Samplers.

Installation:

- Prior to installing the Bio-Trap Sampler, the monitoring well may need to be purged if it has not been sampled in a while. If purging is necessary, MI recommends that three well volumes be removed to ensure contact with formation water and reduce well bore effect.
- Attach the Bio-Trap Sampler's nylon loop (provided) to a nylon line (not provided) and suspend the Bio-Trap Sampler at a depth where significant contaminant concentrations exist. If no data is available on the vertical distribution of contaminants, then suspend the Bio-Trap Sampler in the middle of the saturated screened interval.
- If large fluctuations in the water level are anticipated during the period of incubation, the Bio-Trap Sampler should be suspended from a float (contact MI for further details). Be sure not to suspend the Bio-Trap in the NAPL zone.
- Once installed, incubation times can vary depending upon the scope of the project (routine monitoring and stable isotope probing (SIP) - 30 days and "baited" - 60 days).

Retrieval:

- Open the monitoring well and pull up the Bio-Trap Sampler. Cut and remove the braided nylon line used to suspend the Bio-Trap Sampler.
- Transfer the recovered Bio-Trap Sampler to labeled (well number and date) zippered bags, seal and then double bag in a larger (one-gallon) zippered bag, immediately place on blue ice in a cooler.
- Repeat the above for all the Bio-Trap Samplers from the site. Individual zippered bags containing the Bio-Trap Samplers can be placed in the same one-gallon zippered bag (if there is enough space).
- A chain of custody (COC) form must be included with each shipment of samples.

Hold time for this analysis is 24 hours.

SHIPPING INSTRUCTIONS

Packaging Samples:

1. Samples should be shipped in a cooler with ice or blue ice for next day delivery. If regular ice is used, the ice should be double bagged.
2. A chain of custody form must be included with each shipment of samples. Access our chain of custody at www.microbe.com.

Shipment for Weekday Delivery:

Samples for weekday delivery should be shipped to: Sample Custodian
Microbial Insights, Inc.
10515 Research Drive
Knoxville, TN 37932
(865) 573-8188

Shipment for Saturday Delivery:

Due to the short hold time associated with RNA it is not recommended to send samples for Q-Expression (RNA) for Saturday Delivery.

Bilaga 4

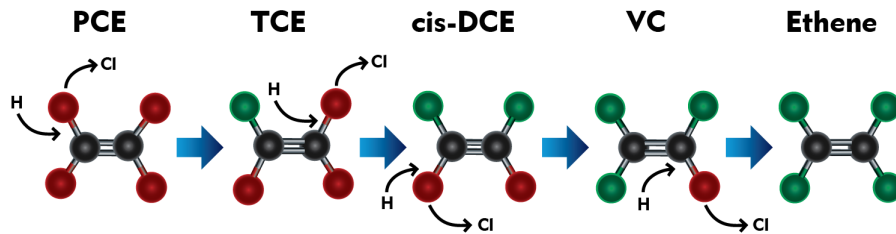
DHC Interpretation Guide




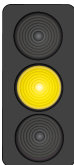

DHC Interpretation

Dehalococcoides 16S rRNA gene (qDHC)

Under anaerobic conditions, tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) can undergo sequential reductive dechlorination through the daughter products *cis*-dichloroethene (*cis*-DCE) and vinyl chloride to nontoxic ethene (1,2).



While a number of bacterial cultures capable of utilizing PCE and TCE as growth supporting electron acceptors have been isolated (3-7), *Dehalococcoides* spp. may be the most important because they are the only bacterial group that has been isolated to date which is capable of complete reductive dechlorination of PCE to ethene (8). In fact, the presence of *Dehalococcoides* spp. has been associated with complete dechlorination to ethene at sites across North America and Europe (9).

Status	<i>Dehalococcoides</i> spp.	Observation
	$\geq 10^4$ (cells/mL)	Lu et al. proposed that a concentration of 1×10^4 DHC cells/mL could be used as a screening criterion to identify sites where reductive dechlorination will yield a generally useful biodegradation rate (10). Similarly, in an internal study conducted with nearly 1000 groundwater samples obtained from sites across the US, ethene production was observed in approximately 80% of samples in which CENSUS® qDHC results were greater than or equal to 10^4 DHC cells/mL.
	10^1 to $< 10^4$ (cells/mL)	When vinyl chloride reductase genes (See DHC functional genes discussion below) are also detected, complete reductive dechlorination of PCE and TCE to ethene may still occur even with moderate DHC concentrations. When the DHC population is below the 10^4 cells/mL criterion proposed by Lu et al. (10), project managers should carefully consider other site-specific data to determine whether subsurface conditions may be limiting reductive dechlorination. For example, the addition of an electron donor may be able to stimulate DHC growth and enhance anaerobic bioremediation.
	$< 10^1$ (cells/mL)	DHC concentrations are low suggesting that complete reductive dechlorination of PCE and TCE to ethene is unlikely to occur under existing conditions. Enhanced anaerobic bioremediation options (biostimulation or bioaugmentation) may need to be considered.

DHC Functional Genes (*tceA*, *bvcA*, *vcrA*)

A “stall” where daughter products *cis*-DCE and vinyl chloride accumulate can occur at PCE- and TCE-impacted sites especially under MNA conditions. The accumulation of vinyl chloride, generally considered more carcinogenic than the parent compounds, is particularly problematic. Although elevated *Dehalococcoides* concentrations correspond to ethene production in numerous studies, the range of chlorinated ethenes metabolized and cometabolized varies among species and strains within the *Dehalococcoides* genus. For example, *Dehalococcoides ethenogenes* str. 195 metabolizes PCE, TCE, and *cis*-DCE and cometabolizes vinyl chloride (8) to produce ethene. Conversely, *Dehalococcoides* sp. CBDB1 utilizes PCE and TCE but does not cometabolize additional chloroethenes (11). Other *Dehalococcoides* strains, such as BAV1, GT and VS, are known to fully dechlorinate *cis*-DCE and VC to ethene (14,16,19). Quantification of reductive dehalogenase genes is used to more definitively confirm the potential for reductive dechlorination of TCE, *cis*-DCE, and vinyl chloride (12-15).

Functional Gene	Observation
-----------------	-------------

TCE Reductase

<i>tceA</i> gene	<p>The <i>tceA</i> gene encodes the enzyme responsible for reductive dechlorination of TCE to <i>cis</i>-DCE in some strains of <i>Dehalococcoides</i>.</p> <p>Absence of <i>tceA</i> does not preclude the potential for reductive dechlorination of TCE in the field since the <i>tceA</i> gene is not universally distributed among all DHC and is not present in other microorganisms capable of reductive dechlorination of TCE (e.g. <i>Dehalobacter</i>).</p> <p>Detection of the <i>tceA</i> gene provides an additional line of evidence indicating the potential for dechlorination of TCE.</p>
-------------------------	---

Vinyl Chloride Reductase

<i>bvcA</i> gene	<p>The <i>bvcA</i> gene encodes the vinyl chloride reductase enzyme responsible for reductive dechlorination of vinyl chloride to ethene by <i>Dehalococcoides</i> sp. str. BAV1 (16).</p> <p>Presence of <i>bvcA</i> gene indicates the potential for reductive dechlorination of VC to ethene.</p> <p>Absence of both <i>bvcA</i> and <i>vcrA</i> genes suggests VC may accumulate.</p> <p>An internal study with ~1,000 samples showed ethene production was observed in 80% of the samples that the DHC population was greater than or equal to 10⁴ cells/mL. The <i>bvcA</i> gene was detected in over 50% of these samples.</p> <p>Van Der Zaan et al (17) noted that the <i>bvcA</i> gene was the only VC reductase gene detected at three of their sites.</p> <p>Alfred Spormann’s laboratory at Stanford University (18) reported that the <i>bvcA</i> gene was the most abundant and active at the outflow of a PCE fed column study. This section of the column was in the DCE to VC stages of reductive dechlorination thus confirming the importance of the <i>bvcA</i> gene for complete reductive dechlorination.</p>
<i>vcrA</i> gene	<p>The <i>vcrA</i> gene encodes the vinyl chloride reductase enzyme responsible for reductive dechlorination of <i>cis</i>-DCE and vinyl chloride by <i>Dehalococcoides</i> sp. strain VS (14).</p> <p>Presence of <i>vcrA</i> gene indicates the potential for reductive dechlorination of DCE and/or VC to ethene.</p> <p>Absence of both <i>bvcA</i> and <i>vcrA</i> genes suggest VC may accumulate.</p> <p>As with the <i>bvcA</i> gene, detection of the <i>vcrA</i> gene is associated with ethene production in internal studies (67%) and vinyl chloride reduction in independent studies (14, 17).</p>

Reporting

Microbial Insights can provide a variety of data packages and reporting levels to suit the needs of any project. Data packages range from simple analytical reports with results only to more complex data packages that include a report narrative, analytical results, QC data, and supporting materials including all raw data and chain-of-custody documentation. The figure below shows our standard report and explains the way values are reported.

Microbial Insights, Inc.

2340 Stock Creek Blvd. Rockford, TN 37853-3044
 Tel. (865) 573-8188 Fax. (865) 573-8133

CENSUS

Client: Company Name	MI Project Number: Unique Laboratory Identifier
Project: Your Project Name	Date Received: Date Samples Arrived

Sample Information

Client Sample ID:	Sample A	Sample B	Sample C
Sample Date:	00/00/0000	00/00/0000	00/00/0000
Units:	cells/mL	cells/mL	cells/mL
Analyst:	Intials	Intials	Intials

Dechlorinating Bacteria

	DHC			
<i>Dehalococcoides spp.</i>		1.84E+05	2.76E+02	2.28E+01 (J)

Functional Genes

tceA Reductase	TCE	6.00E+01	3.23E+01	<4.00E-01
bvcA Reductase	BVC	1.17E+04	1.81E+01	<4.00E-01
vcrA Reducataase	VCR	8.42E+04	1.74E+02	<4.00E-01

"J" value
 Result is an estimated value. This data qualifier (flag) is used when the target gene is detected but at a concentration or abundance below the practical quantification limit (PQL).

< value
 The target gene was not detected at the limit of quantitation (LOQ) reported for that sample.

"I" value
 QA Procedure indicated that the sample may have exhibited PCR inhibition. Although relatively rare, PCR inhibition can occur due to the presence of metals or humic acids at high concentrations in the sample.

Legend:

NA = Not Analyzed NS = Not Sampled J = Estimated gene copies below PQL but above LQL
 < = Result not detected

I = Inhibited

Quality Assurance

Microbial Insights' comprehensive Quality Assurance (QA) Program is the foundation of all laboratory analyses, ensuring that our clients receive high-quality analytical services that are timely, reliable, and meet their intended purpose in a cost effective manner. MI is committed to providing quality data that surpasses regulatory and industry standards, thus enabling the client to make well-informed decisions. MI maintains strict standard operating procedures and QA/QC measures throughout all of the analyses offered. The following Table details specific QA/QC procedures that are used for CENSUS.

QA/QC	Description
Date of Extraction	DNA and RNA extractions are performed the day the samples are received by MI to minimize the possibility of any changes to the microbial community prior to analysis.
Laboratory Method Blanks	An extraction blank (no sample added) is processed alongside each set of field samples from DNA extraction through CENSUS® analysis to ensure that cross contamination has not occurred. Although MI has never experienced this issue, the detection of the CENSUS® target (e.g. <i>Dehalococcoides</i>) in an extraction blank is direct evidence of cross contamination with a sample or contamination of a reagent and would invalidate the results. If this were to occur, MI would re-extract the sample. If not possible to re-extract, MI would contact the client immediately and notate it on the laboratory report.
Laboratory Control Samples (LCS)	A laboratory control sample (LCS) or positive control (target DNA) is included with each CENSUS® plate to confirm amplification and as a continuing calibration check.
Negative Controls	A negative control (no DNA) is included with each CENSUS plate to ensure that cross contamination has not occurred during amplification. As with the extraction blank, detection of CENSUS target (e.g. DHC) in a negative control is direct evidence of contamination and would invalidate the results. If this were to occur, MI would rerun the analysis.

References

1. Freedman, D. L. and J. M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9): 2144-2151.
2. DiStefano, T. D., J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8): 2287-2292.
3. Gerritse, J., V. Renard, T. M. Pedro Gomes, P. A. Lawson, M. D. Collins, and J. C. Gottschal. 1996. *Desulfitobacterium* sp. Strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Archives of Microbiology* 165(2): 132-140.
4. Gerritse, J., O. Drzyzga, G. Kloetstra, M. Keijmel, L. P. Wiersum, R. Hutson, M. D. Collins, and J. C. Gottschal. 1999. Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5212-5221.
5. Holliger, C., G. Schraa, A.J.M. Stams, and A.J.B. Zehnder. 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (9): 2991-2997.
6. Krumholz, L. R., R. Sharp, and S. S. Fishbain. 1996. A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Applied and Environmental Microbiology* 62(11): 4108-4113.
7. Löffler, F.E., R.A. Sanford, and J.M. Tiedje. 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlorospirans* Co23. *Applied and Environmental Microbiology* 62(10): 3809-3813.

8. Maymó-Gatell, X., T. Anguish, and S.H. Zinder. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 3108–3113.
9. Hendrickson, E.R., J. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis, and R.C. Eversole. 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 485-495.
10. Lu, X., J.T. Wilson, and D.H. Kampbell. 2006. Relationship between *Dehalococcoides* DNA in ground water and rates of reductive dechlorination at field scale. *Water Research* 40:3131-3140.
11. Adrian, L, U. Szewzyk, J. Wecke, and H. Görsch. 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408(6812): 580-583.
12. Holmes, V.F., J. He, P.K.H. Lee, and L. Alvarez-Cohen. 2006. Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 5877-5883.
13. Lee, P.K.H., D.R. Johnson, V.F. Holmes, J. He, and L. Alvarez-Cohen. 2006. Reductive dehalogenase gene expression as a biomarker for physiological activity of *Dehalococcoides* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 6161-6168.
14. Müller, J.A., B.M. Rosner, G. von Avendroth, G. Meshulam-Simon, P.L. McCarty, and A.M. Spormann. 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4880-4888.
15. Ritalahti, K.M., B.K. Amos, Y. Sung, Q. Wu, S.S. Koenigsberg, and F.E. Löffler. 2006. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4): 2765-2774.
16. Krajmalnik-Brown, R., T. Hölscher, I. N. Thomson, F. M. Saunders, K. M. Ritalahti, and F. E. Löffler. 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6347–6351.
17. van der Zaan, B., F. Hannes, N. Hoekstra, H. Rijnaarts, W.M. de Vos, H. Smidt, and J. Gerritse. 2010. Correlation of *Dehalococcoides* 16S rRNA and chloroethene-reductive dehalogenase genes with geochemical conditions in chloroethene-contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 76(3):843-850.
18. Behrens, S., M.F., Azizian, P.J. McMurdie, A. Sabalowsky, M.E. Dolan, L. Semprini, and A.M. Spormann. 2008. Monitoring abundance and expression of *Dehalococcoides* species chloroethene-reductive dehalogenases in a tetrachloroethene-dechlorinating flow column. *Applied and Environmental Microbiology* 74(18):5695-5703.
19. Sung, Y., K. M. Ritalahti, R. P. Apkarian, and F. E. Löffler. 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene (TCE)-to-ethene respiring *Dehalococcoides* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1980-1987

Bilaga 5

Phospholipid Fatty Acid Analysis



Phospholipid Fatty Acid Analysis

Interpretation Guidelines

Phospholipids fatty acids (PLFA) are a main component of the membrane (essentially the “skin”) of microbes and provide a powerful tool for assessing microbial responses to changes in their environment. This type of analysis provides direct information for assessing and monitoring sites where bioremediation processes, including natural attenuation, are of interest. Analysis of the types and amount of PLFA provides a broad based understanding of the entire microbial community with information obtained in three key areas viable biomass, community structure and metabolic activity.

What is the detection limit for PLFA?

Our limit of detection for PLFA analysis is ~150 picomoles of total PLFA and our limit of quantification is ~500 picomoles of total PLFA. Samples which contain PLFA amounts at or below 150 pmol cannot be used to determine biomass, likewise samples with PLFA content below ~500 pmol are generally considered to contain too few fatty acids to discuss community composition.

How should I interpret the PLFA results?

Interpreting the results obtained from PLFA analysis can be somewhat difficult, so this document was designed to provide a technical guideline. For convenience, this guideline has been divided into the three key areas.

Viable Biomass

PLFA analysis is one of the most reliable and accurate methods available for the determination of viable microbial biomass. Phospholipids break down rapidly upon cell death (21, 23), so biomass calculations based on PLFA content do not contain ‘fossil’ lipids of dead cells.

How is biomass measured?

Viable biomass is determined from the total amount of PLFA detected in a given sample. Since, phospholipids are an essential part of intact cell membranes they provide an accurate measure of viable cells.

How is biomass calculated?

Biomass levels are reported as cells per gram, mL or bead, and are calculated using a conversion factor of 20,000 cells/pmole of PLFA. This conversion factor is based upon cells grown in laboratory media, and varies somewhat with the type of organism and environmental conditions.

What does the concentration of biomass mean?

The overall abundance of microbes within a given sample is often used as an indicator of the potential for bioremediation to occur, but understanding the levels of biomass within each sample can be cumbersome. The following are benchmarks that can be used to understand whether the biomass levels are low, moderate or high.

Low	Moderate	High
10^3 to 10^4 cells	10^5 to 10^6 cells	10^7 to 10^8 cells

How do I know if a change in biomass is significant?

One of the primary functions of using PLFA analysis at contaminated sites is to evaluate how a community responds following a given treatment, but how does one know if the changes observed between two events are significant? As a general rule, biomass levels which increase or decrease by at least an order of magnitude are considered to be significant. However, changes in biomass levels of less than an order of magnitude may still show a trend. It is important to remember that many factors can affect microbial growth, so factors other than the treatment could be influencing the changes observed between sampling events. Some of the factors to consider are: temperature, moisture, pH, etc. The following illustration depicts three types of changes that occurred over time and the conclusions that could be drawn.

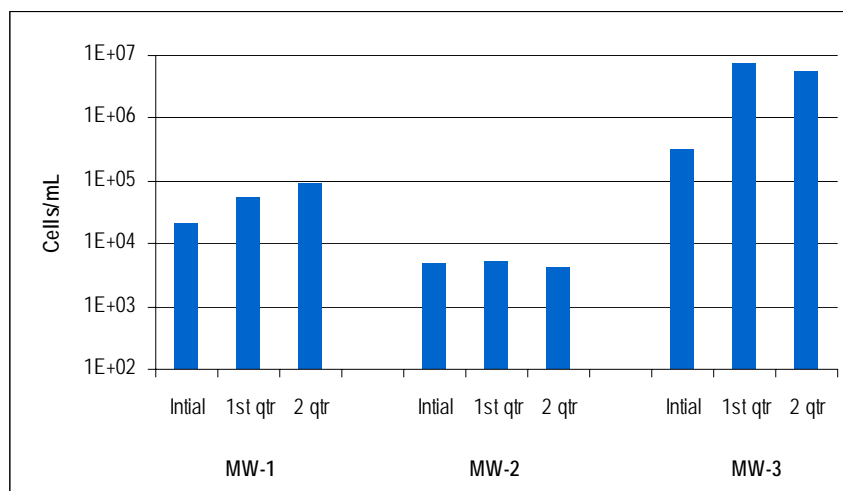


Figure 1. Biomass content is presented as a cell equivalent based on the total amount of phospholipid fatty acids (PLFA) extracted from a given sample. Total biomass is calculated based upon PLFA attributed to bacterial and eukaryotic biomass (associated with higher organisms).

Conclusions from graph above:

- MW-1 showed a trend of biomass levels increasing steadily over time, although cell concentrations were $\sim 10^4$ cells/mL at each sampling event.
- MW-2 showed no notable trends or significant changes in biomass concentrations.
- MW-3 showed a significant increase in biomass levels between the initial and 1st quarter sampling events (from $\sim 10^5$ to $\sim 10^6$ cells/mL).

Community Structure:

The PLFA in a sample can be separated into particular types, and the resulting PLFA “profile” reflects the proportions of the categories of organisms present in the sample. Because groups of bacteria differ in their metabolic capabilities, determining which bacterial groups are present and their relative distributions within the community can provide information on what metabolic processes are occurring at that location. This in turn can also provide information on the subsurface conditions (i.e. oxidation/reduction status, etc.). Table 1 describes the six major structural groups used and their potential relevance to site specific projects.

Table 1. Description of PLFA structural groups.

PLFA Structural Group	General classification	Potential Relevance to Bioremediation Studies
Monoenoic (Monos)	Abundant in Proteobacteria (Gram negative bacteria), typically fast growing, utilize many carbon sources, and adapt quickly to a variety of environments.	Proteobacteria is one of the largest groups of bacteria and represents a wide variety of both aerobes and anaerobes. The majority of Hydrocarbon utilizing bacteria fall within the Proteobacteria
Terminally Branched Saturated (TerBrSats)	Characteristic of Firmicutes (Low G+C Gram-positive bacteria), and also found in Bacteriodes, and some Gram-negative bacteria (especially anaerobes).	Firmicutes are indicative of presence of anaerobic fermenting bacteria (mainly <i>Clostridia</i> / <i>Bacteriodes</i> -like), which produce the H ₂ necessary for reductive dechlorination
Branched Monoenoic (BrMonos)	Found in the cell membranes of micro-aerophiles and anaerobes, such as sulfate- or iron-reducing bacteria	In contaminated environments high proportions are often associated with anaerobic sulfate and iron reducing bacteria
Mid-Chain Branched Saturated (MidBrSats)	Common in sulfate reducing bacteria and also Actinobacteria (High G+C Gram-positive bacteria).	In contaminated environments high proportions are often associated with anaerobic sulfate and iron reducing bacteria
Normal Saturated (Nsats)	Found in all organisms.	High proportions often indicate less diverse populations.
Polyenoic	Found in eukaryotes such as fungi, protozoa, algae, higher plants, and animals.	Eukaryotic scavengers will often rise up and prey on contaminant utilizing bacteria

Following are answers to some of the common questions about community composition and some detailed descriptions of some typical shifts which can be observed between sampling events.

How is the community structure data presented?

Community structure data is presented as percentage (%) of the total amount of PLFA. In order to relate the complex mixture of PLFA to the organisms present, the ratio of a specific PLFA group is determined (detailed in Table 1 above), and this corresponds to the proportion of the related bacterial classification within the overall community structure. Because normal saturated PLFA are found in both prokaryotes (bacteria) and eukaryotes (fungi, protozoa, diatoms etc), their distribution provides little insight into the types of microbes that are present at a sampling location. However, high proportions of normal saturates are often associated with less diverse microbial populations.

How can community structure data be used to manage my site?

It is important to understand that microbial communities are often a mixture of different types of bacteria (e.g. aerobes, sulfate reducers, methanogens, etc) with the abundance of each group behaving like a seesaw, i.e. as the population of one group increases, another is likely decreasing, mostly due to competition for available resources. The PLFA profile of a sample provides a “fingerprint” of the microbial community, showing relative proportions of the specific bacterial types at the time of sampling. This is a great tool for detecting shifts within the community over time and also to evaluate similarities/differences between sampling locations. It is important to note that PLFA analysis of community structure is analyzing the microbes directly, not just secondary breakdown products. So this provides evidence of how the entire microbial community is responding to the treatment.

How do I recognize community shifts and what they mean?

Shifts in the community structure are indications of changing conditions and their effect on the microbial community, and, by extension on the metabolic processes occurring at the sampling location. Some of the more commonly seen shifts within the community are illustrated and discussed below:

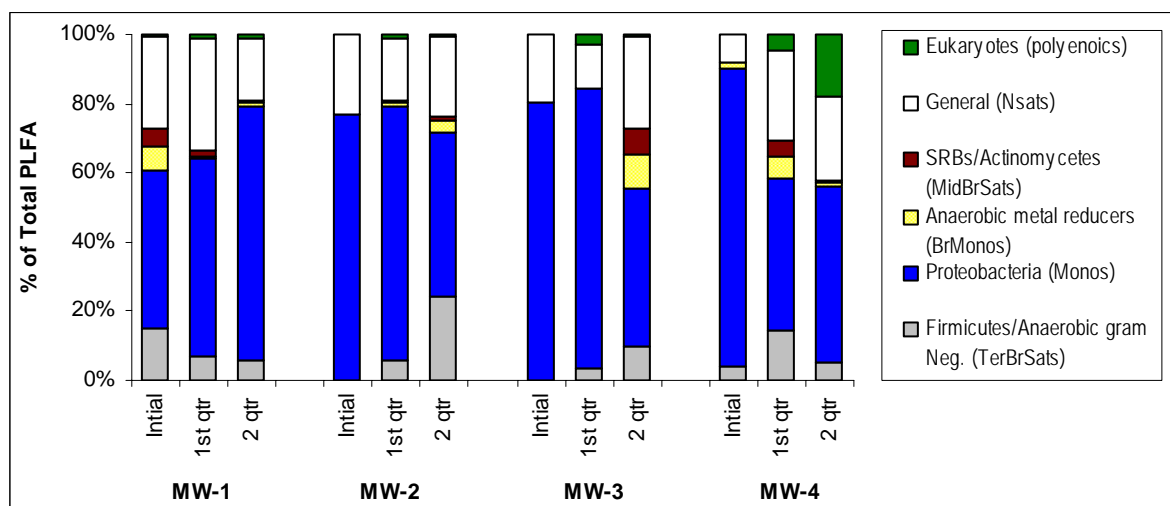


Figure 2. Relative percentages of total PLFA structural groups in the samples analyzed. Structural groups are assigned according to PLFA chemical structure, which is related to fatty acid biosynthesis. See Table 1 for detailed descriptions of structural groups.

- **Increased Proteobacteria**

Proportions of Proteobacteria are of interest because it is one of the largest groups of bacteria and represents a wide variety of both aerobe and anaerobes. The majority of hydrocarbons (including benzene and naphthalene) are metabolized by some member of Proteobacteria, mainly due to their ability to grow opportunistically, quickly taking advantage of available food (i.e. hydrocarbons), and adapting quickly to changes in the environment. The detection of increased proportions of Proteobacteria coupled with increased biomass suggests that the Proteobacteria are consuming something. In situations where it is important to determine the extent to which the Proteobacteria are utilizing anaerobic or aerobic pathways, it is possible to measure relative proportions of specific biomarkers that are associated with anaerobic or aerobic pathways thus separating the Proteobacteria into different groups, based on pathways used. Sample MW-1 from Figure 2 depicts a shift in community structure where the proportion of Proteobacteria has increased over time.

- **Increased Firmicutes/Anaerobic Gram negative bacteria**

Increased proportions of Firmicutes/Anaerobic Gram negative bacteria generally indicate that conditions are becoming more reductive (i.e. more anaerobic). Proportions of Firmicutes are of particular interest in sites contaminated with chlorinated hydrocarbons because Firmicutes include anaerobic fermenting bacteria (mainly *Clostridia/Bacteriodes*-like), which produce the H₂ necessary for reductive dechlorination.

Enhanced bioremediation of chlorinated solvents often employs the injection of fermentable substrates which, when utilized by fermenting bacteria, results in the release of H₂. Engineered shifts in the microbial community can be shown by observing increased proportions Firmicutes following an injection of fermentable substrate. Through long-term monitoring of the community structure it is possible to know when re-injection may be necessary or desirable. Sample MW-2 from Figure 2 depicts a shift in community structure where the proportion of Firmicutes has increased over time.

- **Increased anaerobic metal reducing bacteria (BrMonos) and SRB/Actinomycetes (MidBrSats)**

An increase in the proportions of metal and sulfate reducing bacterial groups, especially when combined with shifts in the other bacterial groups, can provide information helpful to monitoring bioremediation. Generally, an increase in metal and sulfate reducers points to more reduced (anaerobic) conditions at the sampled location. This is especially true if there is an increase in Firmicutes at the same time. Large increases in either metal and sulfate reducers, particularly if accompanied by a decrease in Firmicutes, may suggest that conditions are becoming increasingly reduced. In this situation the metal and sulfate reducers may be out-competing dechlorinators for available H₂, thereby limiting the potential for reductive dechlorination at that location. Sample MW-3 from Figure 2 depicts a shift in community structure where the proportion of metal reducing bacteria has increased over time.

- **Increased Eukaryotes**

Eukaryotes include organisms such as fungi, protozoa, and diatoms. At a contaminated location, an increase in eukaryotes, particularly if seen with a decrease in the contaminant utilizing bacteria, suggests that eukaryotic scavengers are preying upon what had been an abundance of bacteria which were consuming the contaminant. Sample MW-4 from Figure 2 depicts a shift in community structure where the proportion of eukaryotes has increased over time.

Physiological status of Proteobacteria

The membrane of a microbe adapts to the changing conditions of its environment, and these changes are reflected in the PLFA. Toxic compounds or environmental conditions may disrupt the membrane and some bacteria respond by making *trans* fatty acids instead of the usual *cis* fatty acids (7) in order to strengthen the cell membrane, making it less permeable. Many Proteobacteria respond to lack of available substrate or to highly toxic conditions by making cyclopropyl (7) or mid-chain branched fatty acids (20) which point to less energy expenditure and a slowed growth rate. The physiological status ratios for Decreased Permeability (*trans/cis* ratio) and for Slowed Growth (*cy/cis* ratio) are based on dividing the amount of the fatty acid induced by environmental conditions by the amount of its biosynthetic precursor.

What does slowed growth or decreased permeability mean?

Ratios for slowed growth and for decreased permeability of the cell membrane provide information on the “health” of the Gram negative community, that is, how this population is responding to the conditions present in the environment. It should be noted that one must be cautious when interpreting these measures from only one sampling event. The most effective way to use the physiological status indicators is in long term monitoring and comparing how these ratios increase/decrease over time.

A marked increase in either of these ratios suggests a change in environment which is less favorable to the Gram negative Proteobacteria population. The ratio for slowed growth is a relative measure, and does not directly correspond to log or stationary phases of growth, but is useful as a comparison of growth rates among sampling locations and also over time. An increase in this ratio (i.e. slower growth rate) suggests a change in conditions which is not as supportive of rapid, “healthy” growth of the Gram negative population, often due to reduced available substrate (food). A larger ratio for decreased permeability suggests that the environment has become more toxic to the Gram negative population, requiring energy expenditure to produce *trans* fatty acids in order to make the membrane more rigid.

References

1. Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143-169.
2. Cottrell, M.T. and David L. Kirchman. *Appl Environ Microbiol.* 2000 April; 66 (4): 1692-1697.
3. Gillis, M., V. Tran Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbard, A. Willems, P. Segers, K. Kerstens, T. Heulin, and M. P. Fernandez. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:274-289.
4. Dowling, N. J. E., F. Widdel, and D. C. White. 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulfate reducers and other sulfide forming bacteria. *Journal of General Microbiology* 132:1815-1825.
5. Edlund, A., P. D. Nichols, R. Roffey, and D. C. White. 1985. Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species. *Journal of Lipid Research* 26:982-988.
6. Guckert, J. B., C. P. Antworth, P. D. Nichols, and D. C. White. 1985. Phospholipid ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:147-158.
7. Guckert, J. B., M. A. Hood, and D. C. White. 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:794-801.
8. Hedrick, D.B., A. Peacock, J.R. Stephen, S.J. Macnaughton, Julia Brüggemann, and David C. White. 2000. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denatured gradient gel electrophoresis data. *J. Microbiol. Methods*, 41, 235-248.
9. ITRC Internet Training on Natural Attenuation of Chlorinated Solvents in Groundwater: Principles and Practices, Apr 00.
10. Löffler, F. E., Q. Sun, et al. (2000). "16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species." *Appl Environ Microbiol* 66(4): 1369-1374.
11. Mayo-Gatell X, Chien Y, Gossett JM, Zinder SH. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276(5318):1568-71.
12. Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.
13. Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>. National Center for Biotechnology Information. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
14. Overman, J., "Family Chlorobiaceae," in M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.7, November 2, 2001, Springer-Verlag, New York, www.prokaryotes.com.
15. Ringelberg, D. B., G. T. Townsend, K. A. DeWeerd, J. M. Sulita, and D. C. White. 1994. Detection of the anaerobic dechlorinating microorganism *Desulfomonile tiedjei* in environmental matrices by its signature lipopolysaccharide branch-long-chain hydroxy fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14:9-18.
16. Schlotterburg, C. 2001. Mikrobielle Diversität und Dynamik einer 1,2-Dichlorpropan dechlorierenden Mischkultur (Microbial Diversity and Dynamics in a 1,2-Dichloropropane Dechlorinating Mixed Culture). Dissertation, Humboldt University, Berlin, Germany. In German: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/schlotterburg-cord-2001-12-07/PDF/Schlotterburg.pdf>
17. Sharp, R., D. Cossar, and R. Williams. 1995. Physiology and metabolism of *Thermus*. *Biotechnol. Handb.* 9:67-91.
18. Stephen, J. R., Y.-J. Chang, Y. D. Gan, A. Peacock, S. Pfiffner, M. Barcelona, D. C. White, and S. J. Macnaughton. 1999. Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) based approach. *Environmental Microbiology* 1:231-241.
19. Tighe, S.W., de Lajudie, P., Dipietro, K., Lindström, K., Nick, G. & Jarvis, B.D.W. (2000). Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 787-801.
20. Tsitko, I.V. Gennadi M. Zaitsev, Anatoli G. Lobanok, and Mirja S. Salkinoja-Salonen. 1999. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2) 853-855.
21. White, D. C., W. M. Davis, J. S. Nickels, J. D. King, and R. J. Bobbie. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40:51-62.
22. White, D. C., H. C. Pinkart, and D. B. Ringelberg. 1997. Biomass measurements: Biochemical approaches, p. 91-101. In C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter (ed.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
23. White, D. C., and D. B. Ringelberg. 1995. Utility of signature lipid biomarker analysis in determining in situ viable biomass, community structure, and nutritional / physiological status of the deep subsurface microbiota. In P. S. Amy and D. L. Halderman (ed.), *The microbiology of the terrestrial subsurface*. CRC Press, Boca Raton.
24. White, D. C., J. O. Stair, and D. B. Ringelberg. 1996. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology* 17:185-196.
25. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996 Jun;60(2):407-38.

Bilaga 6

Microbial Insights, Inc.





2340 Stock Creek Blvd.
Rockford TN 37853-3044
Phone: (865) 573-8188
Fax: (865) 573-8133
Email: info@microbe.com

Client: Lars Davidsson
WSP Environment & Energy
Laholmsvagen 10
Halmstad, 30248
Sweden

Phone: +46 (0) 705-277360

Fax:

Identifier: 028JI

Date Rec: 09/14/2012

Report Date: 10/03/2012

Client Project #:

Client Project Name: Fagerhult/Rampen

Purchase Order #:

Analysis Requested: CENSUS, PLFA, Standard Bio-Trap

Reviewed By:

NOTICE: This report is intended only for the addressee shown above and may contain confidential or privileged information. If the recipient of this material is not the intended recipient or if you have received this in error, please notify Microbial Insights, Inc. immediately. The data and other information in this report represent only the sample(s) analyzed and are rendered upon condition that it is not to be reproduced without approval from Microbial Insights, Inc. Thank you for your cooperation.

MICROBIAL INSIGHTS, INC.2340 Stock Creek Blvd. Rockford, TN 37853-3044
Tel. (865) 573-8188 Fax. (865) 573-8133**CENSUS****Client:** WSP Environment & Energy
Project: Fagerhult/Rampen**MI Project Number:** 028JI
Date Received: 09/14/2012**Sample Information**

Client Sample ID:	GV22	GV25	GVK17	GVK8	GVK6
Sample Date:	09/11/2012	09/11/2012	09/11/2012	09/11/2012	09/11/2012
Units:	cells/bead	cells/bead	cells/bead	cells/bead	cells/bead
Analyst:	RW	RW	RW	RW	RW

Dechlorinating Bacteria

		GV22	GV25	GVK17	GVK8	GVK6
<i>Dehalococcoides spp.</i>	DHC	1.81E+03	1.40E+04	9.65E+01	1.26E+04	6.04E+05
<i>Dehalobacter spp.</i>	DHBt	1.91E+03	3.82E+04	3.77E+04	1.72E+04	1.19E+06
<i>Desulfuromonas spp.</i>	DSM	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01

Functional Genes

		GV22	GV25	GVK17	GVK8	GVK6
tceA Reductase	TCE	1.61E+01 (J)	1.86E+01 (J)	7.93E+01	7.75E+02	4.66E+01
bvcA Reductase	BVC	6.34E+01	1.03E+02	7.61E+01	1.65E+04	3.60E+04
Vinyl Chloride Reductase	VCR	<2.50E+01	5.44E+03	2.62E+01	5.09E+03	5.04E+04

Phylogenetic Group

		GV22	GV25	GVK17	GVK8	GVK6
Total Eubacteria	EBAC	3.09E+06	7.18E+06	5.41E+06	1.35E+06	8.67E+06
Iron and Sulfate Reducing	IRB/SRB	2.32E+03	1.82E+04	2.54E+04	9.11E+02	1.07E+05
Methanogen	MGN	1.79E+07	1.80E+07	1.17E+07	8.31E+06	9.43E+06

Legend:

NA = Not Analyzed NS = Not Sampled J = Estimated gene copies below PQL but above LQL I = Inhibited
< = Result not detected

Client: WSP Environment & Energy
Project: Fagerhult/Rampen

MI Project Number: 028JI
Date Received: 09/14/2012

Sample Information

Client Sample ID:	GVK3	GV102
Sample Date:	09/11/2012	09/11/2012
Units:	cells/bead	cells/bead
Analyst:	RW	RW

Dechlorinating Bacteria

<i>Dehalococcoides spp.</i>	DHC	4.33E+04	9.28E+01
<i>Dehalobacter spp.</i>	DHBt	3.39E+04	3.97E+03
<i>Desulfuromonas spp.</i>	DSM	<5.00E+01	<5.00E+01

Functional Genes

tceA Reductase	TCE	4.85E+02	3.32E+01
bvcA Reductase	BVC	7.01E+04	8.90E+00 (J)
Vinyl Chloride Reductase	VCR	1.40E+02	7.25E+02

Phylogenetic Group

Total Eubacteria	EBAC	1.28E+07	3.76E+06
Iron and Sulfate Reducing	IRB/SRB	8.52E+03	4.69E+03
Methanogen	MGN	5.65E+07	1.09E+07

Legend:

NA = Not Analyzed NS = Not Sampled J = Estimated gene copies below PQL but above LQL I = Inhibited
 < = Result not detected

MICROBIAL INSIGHTS, INC.

2340 Stock Creek Blvd. Rockford, TN 37853-3044
 Tel. (865) 573-8188 Fax. (865) 573-8133

PLFA

Client: WSP Environment & Energy
Project: Fagerhult/Rampen

MI Project Number: 028JI
Date Received: 09/14/2012

Sample Information

Sample Name:	GV25	GVK17	GVK8	GVK6	GVK3
Sample Date:	09/11/2012	09/11/2012	09/11/2012	09/11/2012	09/11/2012
Sample Matrix:	Std. Bio-Trap	Std. Bio-Trap	Std. Bio-Trap	Std. Bio-Trap	Std. Bio-Trap
Analyst:	BJ	BJ	BJ	BJ	BJ

Biomass Concentrations

Total Biomass (cells/bead)	5.33E+06	1.06E+06	8.21E+05	1.49E+06	2.67E+06
----------------------------	----------	----------	----------	----------	----------

Community Structure (% total PLFA)

Firmicutes (TerBrSats)	5.93	1.99	2.61	6.23	5.23
Proteobacteria (Monos)	62.91	69.71	69.32	61.05	70.19
Anaerobic metal reducers (BrMonos)	0.53	1.26	1.54	4.15	1.20
SRB/Actinomycetes (MidBrSats)	1.32	3.39	6.20	3.12	1.79
General (Nsats)	29.11	19.14	18.71	25.29	20.30
Eukaryotes (polyenoics)	0.20	4.48	1.61	0.18	1.29

Physiological Status (Proteobacteria only)

Slowed Growth	0.03	0.11	0.13	0.07	0.00
Decreased Permeability	0.00	0.11	0.09	0.14	0.05

Legend:

NA = Not Analyzed NS = Not Sampled

Client: WSP Environment & Energy
 Project: Fagerhult/Rampen

MI Project Number: 028JI
 Date Received: 09/14/2012

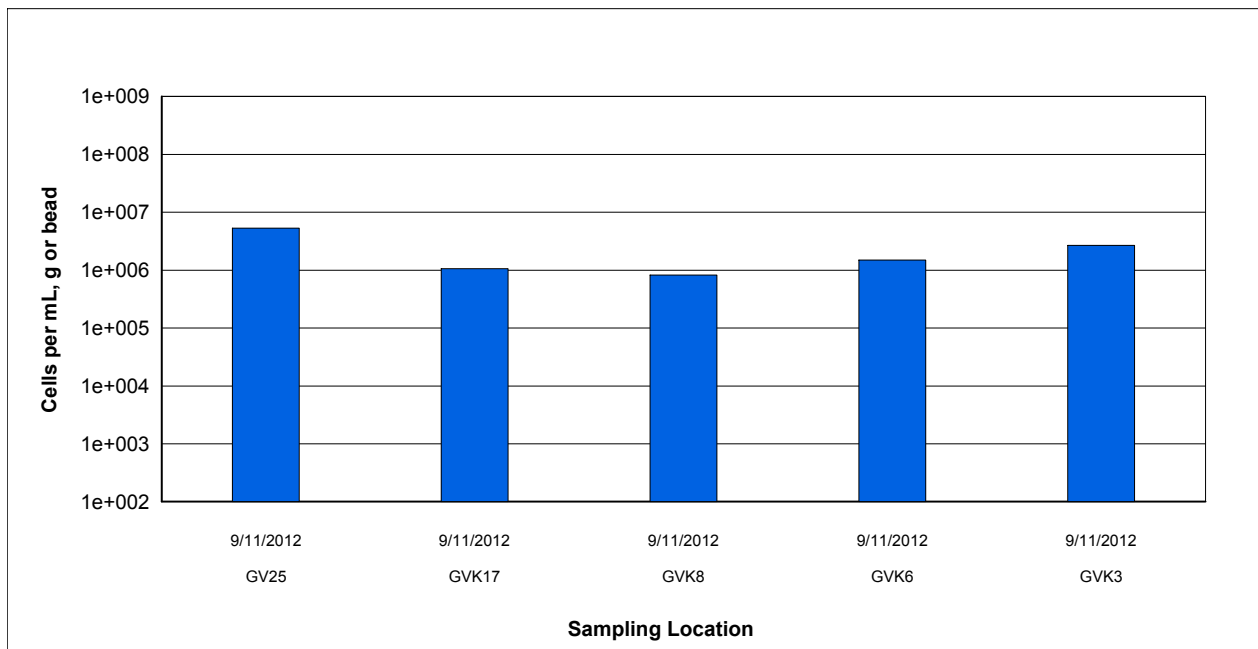


Figure 1. Biomass content is presented as a cell equivalent based on the total amount of phospholipid fatty acids (PLFA) extracted from a given sample. Total biomass is calculated based upon PLFA attributed to bacterial and eukaryotic biomass

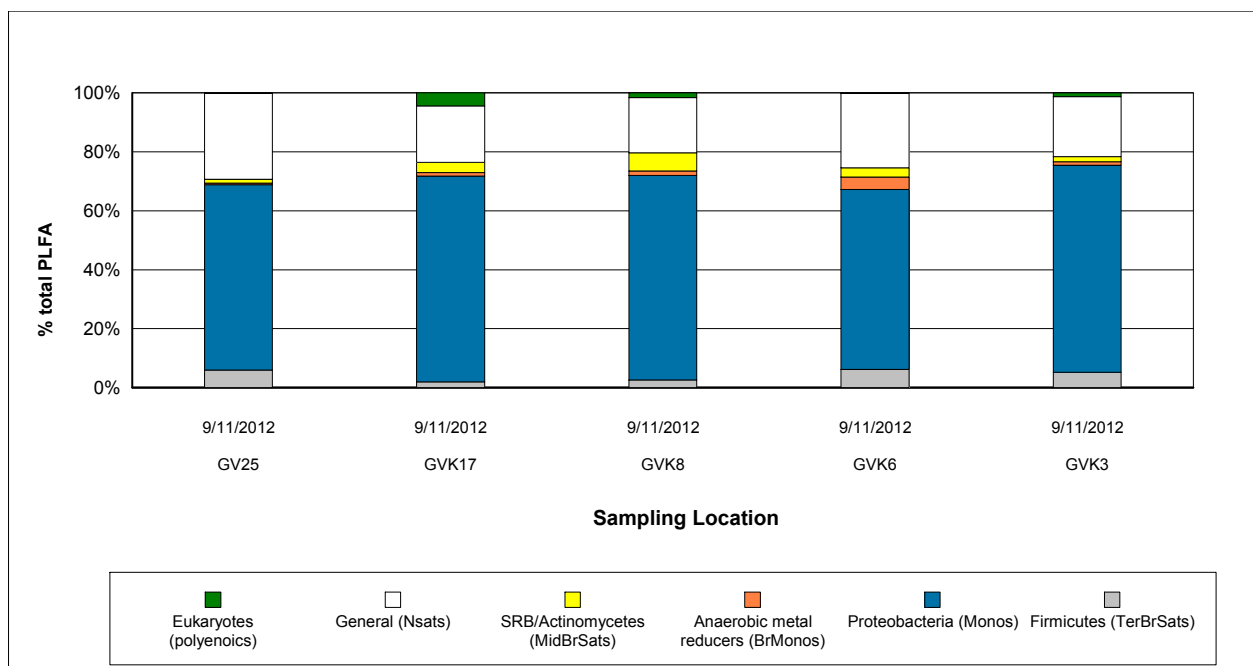


Figure 2. Relative percentages of total PLFA structural groups in the samples analyzed. Structural groups are assigned according to PLFA chemical structure, which is related to fatty acid biosynthesis.











Bilaga 7

Supply List - Deployment



Supply List - Deployment

Following is a table detailing the supplies that were sent for deployment of the bio-trap units and the colors used for the amendment suppliers.

No.	Item	Image
12	Housing Unit	
4	Weights	
13	GEO Sampler*	
13	COC Sampler*	
8	Standard MICRO Sampler	
4	SDC – 9 MICRO Sampler	
2	HRC Amendment Supplier Sponge	
2	3DMe Amendment Supplier Sponge	
2	Sodium Lactate Amendment Supplier Sponge	
2	Molasses Amendment Supplier Sponge	
8	Gray PVC Spacer	

* Extra samplers provided in case of breakage during shipping

Terminology

Samplers are placed in each 15" slotted PVC housing unit. Housing units (e.g. Control, BioStim-LACTATE, BioAug-DHC, etc.) are linked to form an Assembly. An entire Assembly (consisting of 2 or more units) is deployed in each well. **See Figure 1.**

Assembly: An assembly is a collection of two or more units (15" PVC housings) for deployment in a particular monitoring well.

Unit: A unit is a 1.25" x 15" slotted PVC housing to hold samplers. Units have baffled end caps to separate different zones within the monitoring well. Typically each unit will correspond to a treatment (labeled "Control-MNA", "BioStim-LACTATE", "BioAug-DHC"). The metal nameplate is on the bottom of the Unit.

Samplers: ALL units will contain three samplers – One geochemical fingerprint sampler (GEO), one contaminant of concern sampler (COC), and one microbial population sampler (MICRO).

- The **GEO** sampler is a 20 mL amber VOA vial with a blue screw cap.
- The **COC** sampler is a ~ 6½" Passive Diffusion Bag.
- The **MICRO** sampler is a ~ 1" x 3 ½" slotted PVC pipe containing Bio-Sep beads.
- The **SDC-9 MICRO** sampler is a ~ 1" x 3 ½" slotted PVC pipe containing Bio-Sep beads

Amendment Supplier: BioStim and/or BioAug units will include an "Amendment Supplier" which provides an electron donor (e.g. LACTATE, EOS), or an electron acceptor (e.g. ORC, PermeOx, nitrate, sulfate), or a nutrient source intended to stimulate microbial activity. Depending on the type of amendment, the amendment supplier will be one of the following:

- a sponge, or
- a nylon pouch, or
- a clear VOA vial

A sponge placed in the bottom of the unit is typically used as the amendment supplier for viscous amendments such as LACTATE or EOS. For powdered or granular amendments, a nylon pouch is often used as the amendment supplier. A clear VOA vial is used for dissolved amendment solutions. The Control-MNA units have a solid gray PVC spacer as a substitute for the amendment supplier.

Helpful Hints

- **Please wear gloves when handling all Bio-Trap components.**
- **Do NOT discard the foam vial transport holders. These will be needed when you return the unit for analysis.**
- **Remove and discard the clear end cap covers from all vials.**
- **Amber vials are samplers**
- **Clear vials and sponges are suppliers**
- **Color dictates type of sampler or supplier**
- **Prepare one unit at a time.**
- **Once Bio-Traps are assembled, keep in an upright position.**
- **Upon retrieval, ALWAYS replace caps with same color.**

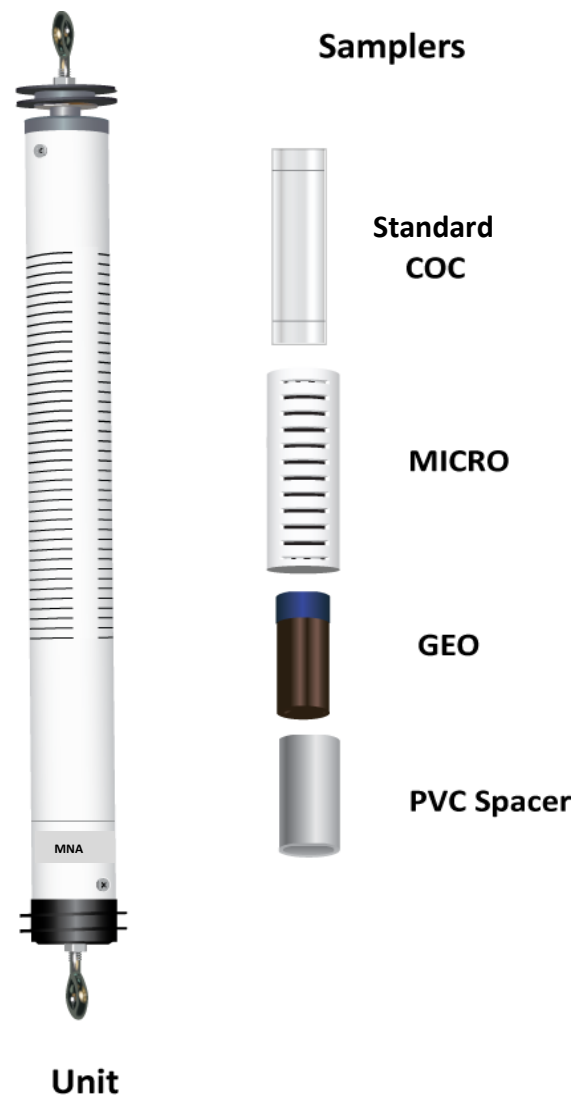
- Do NOT remove the units from the well during the incubation period.

Pre-deployment Instructions

- Remove the **clear end cap covers** from all glass VOA vials. Colored screw caps should NOT be removed.
- The **BOTTOM** of the unit has the metal nameplate (e.g. MNA, LACTATE, BioAug-DHC, etc.)

Control – MNA unit assembly

- Twist off the bottom of unit labeled “MNA”, to fill with samplers.
- First, place the COC Sampler in the housing unit.
- Next insert the Standard MICRO sampler. It does not matter which end goes in first. Be sure to wear gloves.
- Next, place the 20 mL amber VOA vial with the **blue screw cap** (GEO Sampler) into the housing so that the cap is facing the MICRO sampler and the top of the unit.
- Please insert (only one) gray PVC spacer as a substitute for an amendment supplier.
- Hand-tighten the threaded cap back onto unit until it is secure. Remember to store the unit in an upright position.
- A total of four (4) units of this configuration will be required.

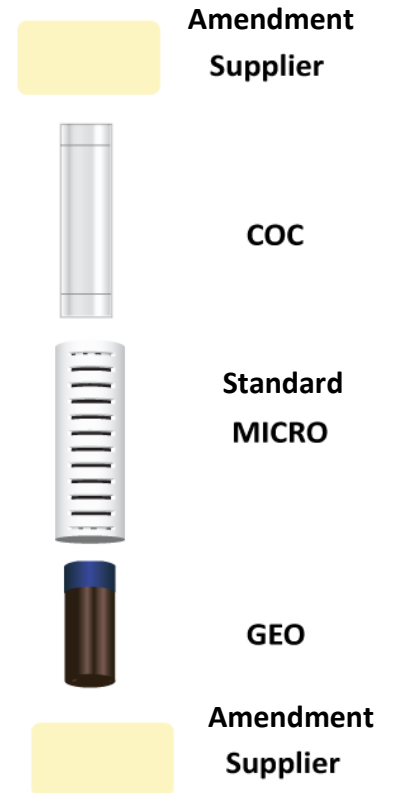


BioStim – HRC, 3DMe, Sodium Lactate, or Molasses unit assembly

- Twist off the bottom of unit labeled “HRC, 3DMe, Sodium Lactate, or Molasses”, to fill with samplers.
- First, place one of the chosen amendment supplier sponges into the unit.
- Next, insert the COC Sampler in the housing unit.
- Insert the Standard MICRO sampler. It does not matter which end goes in first. Be sure to wear gloves.
- Next, place the 20 mL amber VOA vial with the **blue screw cap** (GEO Sampler) into the housing so that the cap is facing the MICRO sampler and the top of the unit. Note: The GEO vial should only be inserted far enough that the bottom of the glass vial is flush with the end of the housing (as pictured).
- **After inserting the GEO sampler**, place another chosen amendment supplier in the threaded cap of the unit.
- Hand-tighten the threaded cap back onto unit until it is secure. Remember to store the unit in an upright position.
- A total of four (4) units with this configuration will be required.

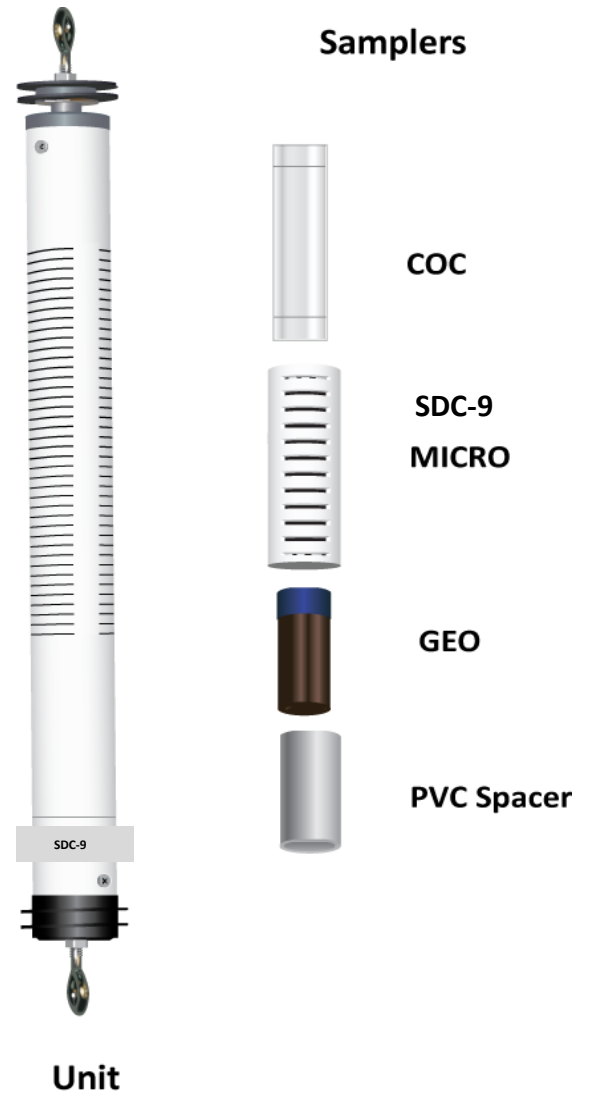


Samplers



BioAug – SDC-9 unit assembly

- Twist off the bottom of unit labeled “SDC-9”, to fill with samplers.
- First, place the COC Sampler in the housing unit
- Next insert the SDC-9 MICRO sampler. It does not matter which end goes in first. Be sure to wear gloves.
- Next, place the 20 mL amber VOA vial with the **blue screw cap** (GEO Sampler) into the housing so that the cap is facing the MICRO sampler and the top of the unit. Note: The GEO vial should only be inserted far enough that the bottom of the glass vial is flush with the end of the housing (as pictured).
- Please insert (only one) gray PVC spacer as a substitute for an amendment supplier.
- Hand-tighten the threaded cap back onto unit until it is secure. Remember to store the unit in an upright position.
- A total of four (4) units of this configuration will be required.



Bio-Trap Assembly and Deployment

Once all 15" PVC units contain the required samplers, the units can be connected to form an assembly for in well deployment.

- **Control-MNA Unit** – The control unit is usually placed at the top of the assembly (shallowest position in the well). Be sure to securely attach a nylon rope or cable to the top of this unit to suspend the assembly in the well. BioStim units will be attached with metal fasteners to the bottom of this unit.
- **BioStim-Treatment A Unit** – Using the metal fasteners, attach the top of this unit to the bottom end of the Control-MNA unit.
- **BioStim-Treatment B Or BioAug-DHC Unit** – Using the metal fasteners, attach the top of this unit to the bottom of the unit above.
- Repeat as necessary.

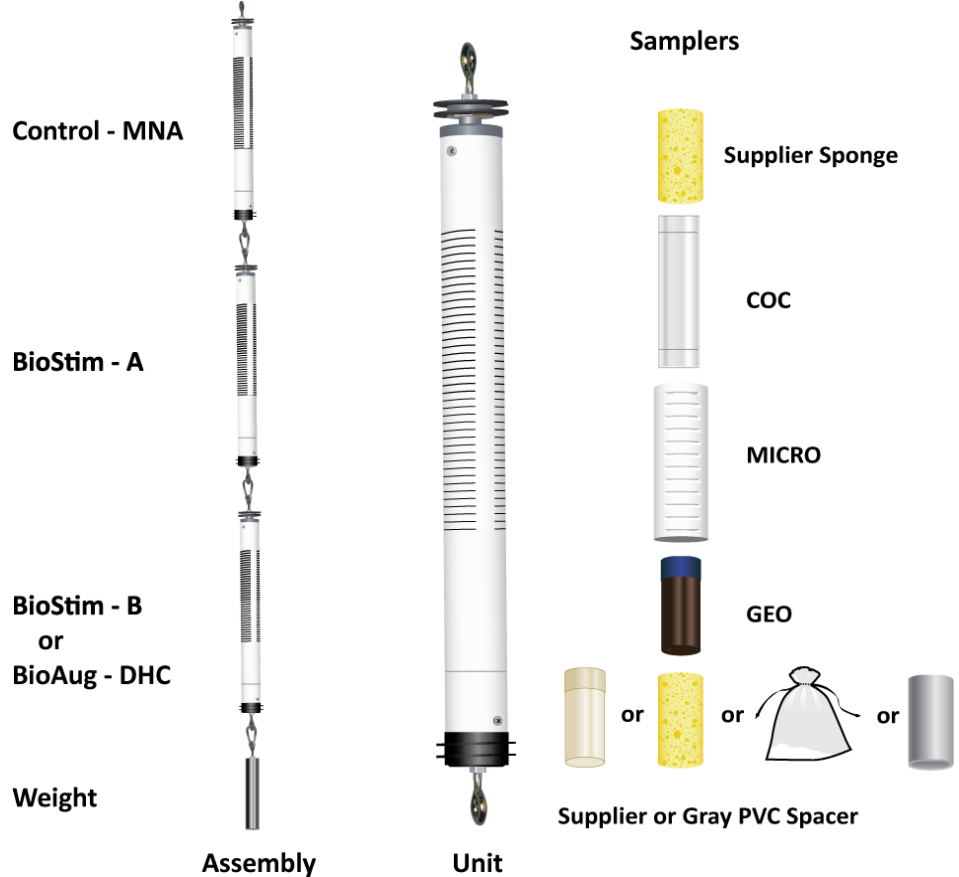



Figure 1. Illustration of Bio-Trap Assembly, Unit, and Samplers. Actual configuration may vary depending on the number of units per well.

When the Bio-Trap Assembly is complete, attach the weight to the bottom of the deepest unit. The Assembly is now ready to be deployed.

Please note: Microbial Insights will send a separate shipment arriving on a later date with the retrieval supplies.

Supply List – Return Kit

Following is a list of the supplies that are being shipped separately (from the deployment supplies) for retrieval of the Bio-Trap Units and their return to Microbial Insights for analysis.

Item	Image
COC vials 40 mL VOA w/Red Caps and HCl Preservative (use one per unit)	-
MEE vials 40 mL clear VOA w/white cap and Trisodium Phosphate Preservative (use one per unit)	-
GEO Sampler Blue return Caps	
Clear ~ 5" tubes for COC sampler (use one per bag)	-
Labels for COC and GEO samplers	-
Bubble Bags for VOA vials	-
Small Zippered Bag labeled for MICRO samplers	-
Large Zippered Bags for Unit Samplers (COC, GEO, and MICRO)	-
Return Box for units, weights, PVC spacers	-
MI Chain of Custody Form	-

Bio-Trap Assembly Retrieval

- After the desired incubation period, carefully retrieve the assembly and remove the nylon line and the weights. **Units contain glass vials that can be broken so please handle with care.**
- Separate the Bio-Trap housing Units from each other and keep in an upright position.
- Open one Unit at a time and carefully remove all contents. In some cases contents may become lodged inside housing. If this occurs, remove two screws from the top of the unit and gently remove the top of the PVC housing. This can facilitate access to the contents, preventing damage to samplers. **DO NOT DISCARD THE PVC HOUSING UNIT.**
- **Label and Package all contents from one unit before opening another unit.**
- Label the vials with the provided preprinted labels directly onto all vials. It is ok if the label overlaps the writing or covers the cap. Please include the well and unit type (Control, BioStim, BioAug, etc.) Please do not place the labels on the bubble wrap.
- Place the MICRO sampler (1" x 3 ½" slotted PVC containing bio-sep beads) into a silver zippered bag (provided). Pull tab at the top where notched to open bag, insert sampler, and label appropriately.
- The two vials provided per unit (one COC vial, one MEE vial) will be filled with the water from the COC sampler bag.
 - First, open the cap for the COC vial (with **red** cap and HCl preservative) and holding the COC sampler bag upright; above the vial, poke the bag with one end of the clear tube provided, making sure that the other end is positioned inside the vial. This ensures the flow of the liquid from the bag to the vial. Be careful not to spill any liquid. Fill the vial completely so that there is no head space / air bubble and then screw the cap on it. Please ensure COC vial is full before proceeding to next step.
 - Next, fill the MEE vial (with white cap and Trisodium Phosphate preservative) in the same way. Please note: If liquid volume is insufficient to fill MEE vial completely, simply fill as much as possible. MEE analysis can be performed from GEO vial if necessary.
- Then, remove the **blue screw cap** from the 20 mL VOA vial (GEO sampler) and replace with the extra blue screw cap provided. Please note that it is okay for the GEO sampler to be exposed to air. The original membrane will be removed with the cap.
- Sponge and nylon pouch amendment suppliers can be discarded as investigation derived waste.
- Once all screw caps have been replaced, tightly wrap each vial in a bubble wrap bag.
- Place all of the vials and MICRO sampler from one unit into a large zippered bag so that all samplers from a unit are in one bag.
- Place large bag containing all samplers within a cooler packed with ice as quickly as possible after retrieval and for shipping.

- Complete the MI chain of custody form.
- Ship separately the Bio-Trap housing units, weights, well caps, glass i-chem bottles and PVC spacers to Microbial Insights in the return box provided with the prepaid ground shipping label. See shipping instructions below:

Shipping Instructions

MICRO samplers and all VOA vials need to be shipped on ice (or blue ice) for next day delivery. If regular ice is used, the ice should be double bagged.

Samples should be shipped to: Sample Custodian
Microbial Insights, Inc.
2340 Stock Creek Blvd.
Rockford, TN 37853-3044
(865) 573-8188

INTERNATIONAL SHIPPING INSTRUCTIONS

In order to expedite samples through customs, shipments must contain proper documentation. Required documents are listed below. For a complete description please visit www.fedex.com.

Documents to send along with samples (can be found at www.microbe.com)

- Documents to be placed on the outside of the box:
 - 3 copies of the commercial invoice with 3 copies of the shipping label.
 - MI Soil permit should be placed on the outside of the box in a way it is visible to customs. Please mark the shipment for non hazardous items.
 - Also sign and include a copy of the toxic substance control act (TSCA) form.
- Documents to be included inside the box:
 - Please have a completed COC form with all the necessary information for both reporting & invoicing; if you are unsure of the analyses information please contact us.

Note: Microbial Insights, Inc is closed on weekends. Please contact us prior to shipping, if the delivery of the samples is going to be on a weekend. Samples received for Saturday Delivery will be frozen immediately upon receipt by Microbial Insights staff to minimize changes in the microbial community.

MI Sample Cancellation Policy

MI understands that on rare occasions our clients may want to cancel an order or individual samples. However, because samples are processed promptly upon receipt the following cancellation surcharges will apply. If cancellation is within 24 hours of sample receipt there will be no charge. If cancellation is requested 24 hours up to 3 working days there will be a 50% surcharge to cover our processing to that point. After 3 working days the full charge will apply.

The Bio-Trap housing units, PVC spacers, well caps, glass i-chem bottles and weights must be returned to Microbial Insights, but should be shipped separately (without ice) using the boxes and prepaid ground delivery bill as provided.

Bilaga 8

**Site Logic Report – Bio-Trap In Situ
Microcosm Study**



SITE LOGIC Report

Bio-Trap In Situ Microcosm Study

Contact: Lars Davidsson
Address: WSP Environment & Energy – Halmstad, Sweden
Laholmsvagen 10
Halmstad, 30248
Sweden

Phone: +46 (0) 705-277360
Email: lars.davidsson@wpsgroup.se

MI Identifier: 029JI

Report Date: 10/9/2012

Project: SGI/Rampen
Comments: Revised 11/26/2012

Executive Summary

Bio-Trap® *In Situ* Microcosm studies were performed in monitoring wells GV1, GV52, GV105, and GV106 to evaluate biodegradation of trichloroethene (TCE) and associated daughter products under existing site conditions and to determine whether biostimulation (BioStim) or bioaugmentation (BioAug) would enhance reductive dechlorination. Control units simulating existing subsurface conditions contained no exogenous electron donors or commercial biological cultures and were deployed in all study wells. BioStim units were amended with either 3DMe™, HRC™, sodium lactate, or molasses as an electron donor. The BioAug units were inoculated with the SDC9 culture and amended with an electron donor. *In Situ* Microcosms were recovered after a 98 day incubation period for CENSUS analysis and quantification of contaminant concentrations, dissolved gases, and anions. Summaries of the results are provided in Tables 1 and 2.

Monitoring Well GV1

- In the Control unit, *Dehalococcoides* spp. (10^5 cells/bd) and vinyl chloride reductase genes (10^4 copies/bd) were detected at high concentrations indicating the potential for complete reductive dechlorination of TCE and daughter products under existing site conditions.
- Similarly, *Dehalobacter* spp. were detected at a relatively high concentration in the Control unit indicating the presence of a bacterial population capable of reductive dechlorination of TCE, 1,1,1-TCA, and 1,1-DCA.
- The CENSUS® results for the Control unit revealed a substantial population of halo-respiring bacteria at GV1 under existing site conditions and are consistent with site activities and historical groundwater monitoring data.
 - In the autumn of 2010, the electron donor 3DMe™ was injected into the subsurface in the vicinity of monitoring well GV1.
 - Based on previous CENSUS® results, the *Dehalococcoides* population had increased from below the laboratory detection limit in January 2010 prior to 3DMe injection to 5.45×10^5 cells/bd in March 2011 following electron donor injection at the site.
 - Moreover, ethene production was observed in the Control unit and groundwater monitoring results indicated enhanced vinyl chloride and ethene formation following electron donor injection in the field which is consistent with elevated concentrations of *Dehalococcoides* and vinyl chloride reductase genes.
 - Finally, dissolved methane was detected at a relatively high concentration in the Control unit indicating anaerobic conditions generally conducive to reductive dechlorination.
- In the BioStim unit, the *Dehalococcoides* and *Dehalobacter* populations were generally similar to those observed in the Control unit.
- In addition, the dissolved ethene concentration in the BioStim unit (73 µg/L) was essentially the same as observed in the Control unit (70 µg/L) suggesting that the addition of another electron donor did not appreciably enhance reductive dechlorination relative to that observed under existing site conditions.
- In the BioAug unit, the *Dehalococcoides* population and concentration of vinyl chloride reductase genes were substantially greater than observed in the Control or BioStim units.
- However, dissolved ethene production in the BioAug unit (83 µg/L) was not overwhelmingly greater than observed in the Control unit where *Dehalococcoides* were detected at relatively high concentrations.
- Overall, the ISM results along with groundwater monitoring data suggest that reductive dechlorination is occurring in the vicinity of GV1 under existing site conditions and that further biostimulation and bioaugmentation may not be warranted currently.

Monitoring Well GV52

- Monitoring well GV52 is also located in the vicinity of the previous injection of 3DMe conducted in the autumn of 2010.
- As described for GV1, groundwater monitoring results for well GV52 have shown a decrease in TCE concentration coupled with an increase in vinyl chloride and ethene concentrations.
- Consistent with daughter product formation, *Dehalococcoides* and vinyl chloride reductase genes were detected at high concentrations in the Control unit in the current study.
- Likewise, *Dehalobacter* spp. were detected on the order of 10^5 cells/bd indicating the presence of a substantial population of halorespiring bacteria.
- The detection of dissolved methane in the Control unit suggested that existing subsurface conditions are anaerobic and generally conducive to reductive dechlorination although sulfate, a competing electron acceptor, was also detected.
- *Dehalococcoides* and *Dehalobacter* concentrations in the BioStim unit, were slightly lower than detected in the Control unit indicating that electron donor addition did not promote growth of these key halorespiring bacteria at least within the deployment period.
- In addition, vinyl chloride and ethene concentrations detected in the BioStim unit were similar to those detected in the Control.
- In the BioAug unit, vinyl chloride and ethene concentrations were substantially greater than in the BioStim and Control units.
- However, the concentrations of *Dehalococcoides* spp. and vinyl chloride reductase genes in the BioAug unit were only about an order of magnitude greater than in the Control or the BioStim unit.
- Considering the relatively minor differences in populations of halorespiring bacteria, the substantially greater production of vinyl chloride and ethene in the BioAug unit is more likely a result of subsurface variability in contaminant concentrations.
- While previous CENSUS® results are not available for GV52, the ISM results along with groundwater monitoring data suggest that reductive dechlorination has occurred in the vicinity of GV52 under existing site conditions and that further biostimulation and bioaugmentation may not be warranted currently.

Monitoring Well GV105

- Monitoring well GV105 is located outside the previous 3DMe injection zone and based on distance and presumed groundwater velocity, electron donor transport from Ramp 36 seemed unlikely.
- VFAs in the Control and BioStim units were detected at similar concentrations suggesting aqueous transport (cross-talk) between the units during the deployment period despite the use of baffles.
- However, a significant increase in the vinyl chloride concentration was noted during the October 2011 groundwater sampling event suggesting enhanced reductive dechlorination.
- Therefore, while the possibility of cross-talk between units cannot be eliminated, the elevated concentrations of *Dehalococcoides* spp. (10^5 cells/bd) and vinyl chloride reductase genes (10^4 copies/bd) detected in the Control unit are not unreasonable in light of the most recent groundwater monitoring results.
- While fairly low, dissolved methane was detected in the Control unit at least suggesting anaerobic conditions.
- *Dehalococcoides* and *Dehalobacter* populations in the BioStim unit were similar to those detected in the Control.
- Likewise, the ethene concentration in the BioStim unit was not greater than observed in the Control suggesting that electron donor addition did not appreciably enhance reductive dechlorination within the deployment period.
- In the BioAug unit, *Dehalococcoides* spp. and vinyl chloride reductase genes were detected at very high concentrations (10^7 cells/bd) indicating maintenance of a high population of bacteria capable of complete reductive dechlorination of TCE to ethene.
- VFAs were detected at high concentrations in the BioAug unit indicating fermentation of the supplied electron donor.

- Despite the additional electron donor and high populations of *Dehalococcoides* however, ethene production in the BioAug unit was comparable to that observed in the Control and BioStim units.

Monitoring Well GV106

- Monitoring well GV106 is located outside the previous 3DMe injection zone and based on distance and presumed groundwater velocity, electron donor transport from Ramp 36 seemed unlikely.
- As with GV105, VFAs were detected in the Control unit at GV106 raising the possibility of aqueous transport (cross-talk) between the units during the deployment period.
- However, VFA concentrations in the Control unit were significantly lower than detected in either the BioStim or BioAug units suggesting that, if it occurred, transport of electron donor between ISM units was limited.
- As reported for GV105, a significant increase in the vinyl chloride concentration was noted at GV106 during the October 2011 groundwater sampling event.
- While possibly due to temporal variability or transport from upgradient, the increase in vinyl chloride concentrations at GV105 and GV106 at least suggests enhanced reductive dechlorination of cis-DCE.
- Therefore, the detection of *Dehalococcoides* and vinyl chloride reductase genes at relatively high concentrations in the Control unit appears reasonable and consistent with the recent trend in contaminant concentrations at GV106.
- *Dehalococcoides* and *Dehalobacter* populations in the BioStim unit were slightly lower than those detected in the Control.
- In the BioAug unit, *Dehalococcoides* spp. and vinyl chloride reductase genes were detected at very high concentrations (10^7 cells/bd) indicating maintenance of a high population of bacteria capable of complete reductive dechlorination of TCE to ethene.
- However, vinyl chloride and ethene concentrations for all three ISM units were similar.

Overall Observations and Recommendations

- Groundwater pH at GV1 and GV52 were considerably lower than the optimum range for most known halo-respiring bacteria. For GV106, the pH was low in the BioStim and BioAug units that received electron donor.
- The CENSUS results for the Control units indicated the presence of a substantial *Dehalococcoides* population capable of complete reductive dechlorination of TCE to ethene within the area of the 3DMe injection (GV1 and GV52).
- While perhaps unexpected, *Dehalococcoides* and vinyl chloride reductase genes were also detected at high concentrations in the Control units deployed in the downgradient wells GV105 and GV106.
- However, the CENSUS results for GV105 and GV106 are consistent with the increase in daughter product concentrations during the October 2011 groundwater sampling event.
- Based on the current results, MI recommends periodic quantification of *Dehalococcoides* and *Dehalobacter* populations at select monitoring wells as a cost efficient approach to monitor the potential for reductive dechlorination of TCE and daughter products under existing site conditions.

Overview of Approach

Site managers have frequently turned to laboratory microcosms or small pilot studies to evaluate bioremediation. However, duplication of *in situ* conditions in the laboratory is difficult and the results often do not correlate to the field. Pilot studies are performed in the field but are often prohibitively expensive as an investigative tool. Bio-Trap studies serve as cost-effective, *in situ* microcosms providing microbial, chemical, and geochemical evidence to evaluate biodegradation as a treatment mechanism and to screen remedial alternatives.

Typically each Bio-Trap Unit will contain samplers to evaluate the following:

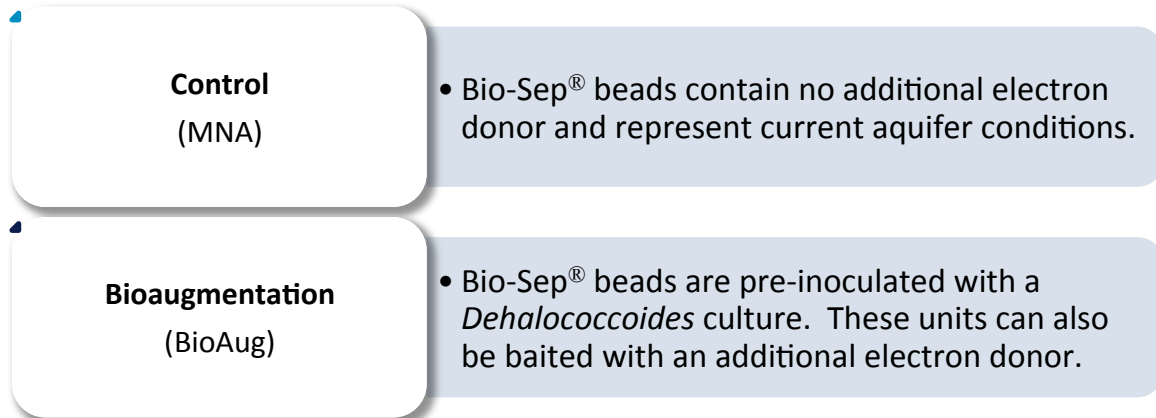
Geochemical Fingerprint (GEO)	•20 mL amber VOA vial with a nylon screened cap designed for assessment of a variety of geochemical parameters including anions and metabolic acids.
Contaminant of Concern (COC)	•40 mL amber VOA vial with a low density polyethylene (LDPE) seal designed for analysis of a variety of COCs including chlorinated solvents and petroleum hydrocarbons.
Microbial Populations (MICRO)	•PVC cassette containing Bio-sep beads which provide a large surface area for microbial attachment and were designed for analysis by a variety of molecular biological tools (MBTs).

How does it work?

The MICRO sampler (microbial populations) contains Bio-Sep® beads, an engineered composite of Nomex® and powdered activated carbon which provides an incredibly large surface area (~600 m²/g) that is readily colonized by subsurface microorganisms. In addition to a matrix for microbial growth, the Bio-Sep® beads can be “baited” with amendments including electron donors (e.g. hydrogen releasing compounds) to investigate biostimulation approaches to enhance biodegradation. The Bio-Trap units also contain a COC (contaminant of concern) sampler to measure contaminant concentrations, daughter product formation, and dissolved gases and a GEO (geochemical fingerprint) sampler for quantification of geochemical parameters (nitrate, iron, sulfate, etc.), chloride production and metabolic acids (pyruvic, lactic, acetic, propionic, etc).

Bio-Trap® *In Situ* Microcosm studies at chlorinated solvent sites typically include three types of Bio-Trap Units deployed within a monitoring well. Each Bio-Trap Unit corresponds to one of the three most common remedial options: monitored natural attenuation (MNA), Biostimulation (BioStim), and Bioaugmentation (BioAug). All three Bio-Trap Units contain COC and GEO samplers for chemical and geochemical analyses. The key difference between the Bio-Trap Units is in the MICRO sampler.

Types of Bio-Trap Units typically deployed and MICRO sampler configurations:



MNA Unit: The purpose of the Control Bio-Trap Unit is to quantify contaminant degrading bacteria and daughter product formation under monitored natural attenuation (MNA) conditions and to serve as a baseline for comparison to BioStim and/or BioAug Units.

Following in-well deployment, DNA or phospholipid fatty acids can be extracted from the Bio-Sep beads for CENSUS or PLFA analyses. For example, DNA extracted from the Bio-Sep beads can be used in CENSUS analysis of *Dehalococcoides* (qDHC) and vinyl chloride reductase (qVC) genes to evaluate the potential for complete reductive dechlorination of PCE to ethene under MNA conditions. The VOC and anion samplers can be used to determine concentrations of contaminants, daughter products, dissolved gases, terminal electron acceptors, and chloride.

BioAug Unit: The Bioaugmentation Bio-Trap Unit is designed to evaluate bioaugmentation as a treatment technology. The MICRO sampler contains Bio-Sep beads pre-inoculated with the desired commercial culture and also contains an electron donor of choice. As with the MNA and BioStim Units, the BioAug Unit also contains a COC and GEO samplers for chemical analyses.

Results

Table 1. Summary of the results obtained for *In Situ* Microcosm Units.

Sample Information	GV1-MNA	GV1-BioStim	GV1-BioAug	GV52-MNA	GV52-BioStim	GV52-BioAug
Treatment	Control	3DMe	3DMe	Control	Molasses	Molasses
Microbial Populations (cells/bead)						
Total Eubacteria	6.44E+06	2.05E+06	6.44E+06	6.06E+06	3.71E+06	2.11E+07
<i>Dehalococcoides</i> spp.	1.88E+05	5.54E+05	3.00E+07	2.02E+06	7.50E+05	3.40E+07
tceA Reductase	1.42E+05	2.04E+05	1.87E+07	1.19E+06	4.32E+05	2.23E+07
bvcA Reductase	5.14E+03	2.87E+04	5.36E+03	6.58E+03	4.08E+03	1.00E+04
vcrA Reductase	5.50E+04	2.09E+05	1.25E+07	6.55E+05	2.03E+05	1.15E+07
<i>Dehalobacter</i> spp.	1.58E+04	5.73E+03	1.34E+03	1.22E+05	4.51E+04	6.21E+04
<i>Desulfuromonas</i> spp.	<5.00E+01	<5.00E+01	3.07E+01	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01
PLFA						
Total PLFA Biomass (Cells/bead)	2.37E+06	NA	NA	NA	NA	NA
Firmicutes (%)	6.5	NA	NA	NA	NA	NA
Proteobacteria (%)	63.2	NA	NA	NA	NA	NA
Anaerobic metal reducers (%)	1.3	NA	NA	NA	NA	NA
Actinomycetes (%)	1.8	NA	NA	NA	NA	NA
General (%)	26.6	NA	NA	NA	NA	NA
Eukaryotes (%)	0.6	NA	NA	NA	NA	NA
Slowed Growth	0.01	NA	NA	NA	NA	NA
Decreased Permeability	0.05	NA	NA	NA	NA	NA
Contaminant of Concern (µg/L)						
PCE	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
TCE	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12
1,1-DCE	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6
cis-1,2-DCE	< 20	< 20	< 20	< 20	15 BRL	15
Vinyl Chloride	3.4	4.0	< 2	18	28	110
1,1,1-TCA	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
1,1-DCA	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
CA	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Dissolved Gases (µg/L)						
Ethene	70	73	83	1.3	1.8	72
Ethane	< 0.2	< 0.2	0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Methane	2,460	1,380	2,730	2,330	2,150	890

Sample Information	GV1-MNA	GV1-BioStim	GV1-BioAug	GV52-MNA	GV52-BioStim	GV52-BioAug
Treatment	Control	3DMe	3DMe	Control	Molasses	Molasses
Anions (mg/L)						
Nitrate	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5
Nitrite	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5
Sulfate	22	68	< 1.5	98	95	48
Chloride	17	42	79	160	140	310
Phosphate	1.08	40	7.8	16.8	11.8	19
VFA (mg/L)						
Lactate	< 1.5	2,740	18	6	35	720
Acetate	< 1.5	40	200	430	300	580
Propionate	< 1.5	52	170	48	26	76
Butyrate	< 1.5	50 est	18 est	540	380	460
Formate	< 1.5	< 10	< 5	28	23	< 10
Other Parameters						
pH	4.4	3.9	7.2	4.8	4.7	4.8

NA – not analyzed. BRL - below report limit.
Est indicates an estimated value.

Table 2. Summary of the results obtained for *In Situ* Microcosm Units.

Sample Information	GV105-MNA	GV105-BioStim	GV105-BioAug	GV106-MNA	GV106-BioStim	GV106-BioAug
Treatment	Control	Lactate	Lactate	Control	HRC	HRC
Microbial Populations (cells/bead)						
Total Eubacteria	3.38E+07	1.53E+06	1.67E+06	1.64E+07	1.08E+05	6.59E+05
<i>Dehalococcoides spp.</i>	1.29E+05	1.26E+05	1.82E+07	2.16E+05	2.93E+04	1.22E+07
tceA Reductase	8.98E+04	1.32E+05	8.57E+06	6.41E+04	2.04E+04	8.68E+06
bvcA Reductase	7.94E+02	7.50E+01	4.56E+01	2.81E+02	2.34E+01	2.63E+01
vcrA Reductase	3.84E+04	4.72E+04	5.21E+06	6.14E+04	8.82E+03	7.19E+06
<i>Dehalobacter spp.</i>	1.95E+05	2.93E+05	1.08E+04	7.73E+03	4.07E+02	5.60E+00
<i>Desulfuromonas spp.</i>	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01	<5.00E+01
PLFA						
Total PLFA Biomass (Cells/bead)	3.10E+06	NA	NA	NA	NA	NA
Firmicutes (%)	4.11	NA	NA	NA	NA	NA
Proteobacteria (%)	69.6	NA	NA	NA	NA	NA
Anaerobic metal reducers (%)	1.8	NA	NA	NA	NA	NA
Actinomycetes (%)	1.0	NA	NA	NA	NA	NA
General (%)	23.3	NA	NA	NA	NA	NA
Eukaryotes (%)	0.2	NA	NA	NA	NA	NA
Slowed Growth	0.04	NA	NA	NA	NA	NA
Decreased Permeability	0.05	NA	NA	NA	NA	NA
Contaminant of Concern (µg/L)						
PCE	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
TCE	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12	< 12
1,1-DCE	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6
cis-1,2-DCE	< 20	< 20	< 20	17 BRL	< 20	< 20
Vinyl Chloride	5.1	< 2	1.4 BRL	3.1	< 2	1.1 BRL
1,1,1-TCA	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
1,1-DCA	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
CA	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Dissolved Gases (µg/L)						
Ethene	1.6	0.2	3.9	2.2	1.0	2.6
Ethane	< 0.2	< 0.2	0.3	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Methane	280	1.1	260	200	37	33

Sample Information	GV105-MNA	GV105-BioStim	GV105-BioAug	GV106-MNA	GV106-BioStim	GV106-BioAug
Treatment	Control	Lactate	Lactate	Control	HRC	HRC

Anions (mg/L)

Nitrate	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5
Nitrite	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5
Sulfate	86	250	2.5	< 1.5	82	91
Chloride	180	260	270	89	93	120
Phosphate	0.88	6.15	31.6	14.6	23	77.5

VFA (mg/L)

Lactate	< 5	< 10	3,890	< 5	3,760	4,610
Acetate	160	170	1,300	130	6 BRL	15
Propionate	250	400	2,160	140	92	210
Butyrate	< 5	< 10	50 est	< 5	70 est	130 est
Formate	< 5	< 10	< 20	< 5	< 10	< 10

Other Parameters

pH	7.2	7.1	7.2	6.8	3.6	3.9
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

NA – not analyzed. BRL - below report limit.
Est indicates an estimated value.

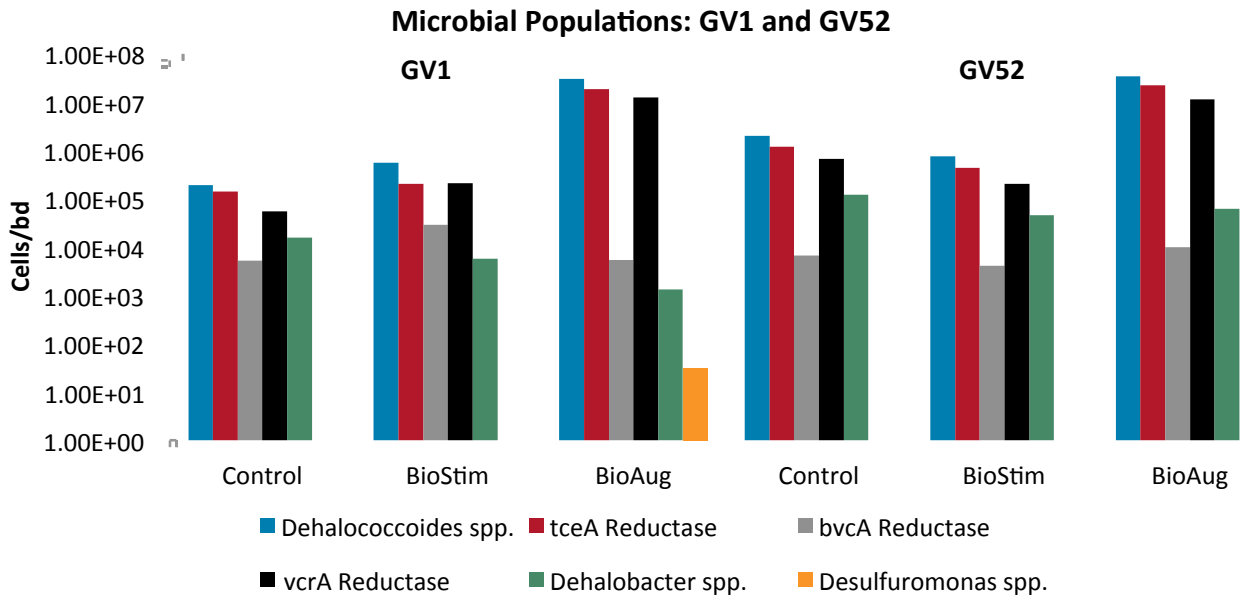


Figure 1. CENSUS® results for MICRO samplers deployed in each Bio-Trap *In Situ* Microcosm.

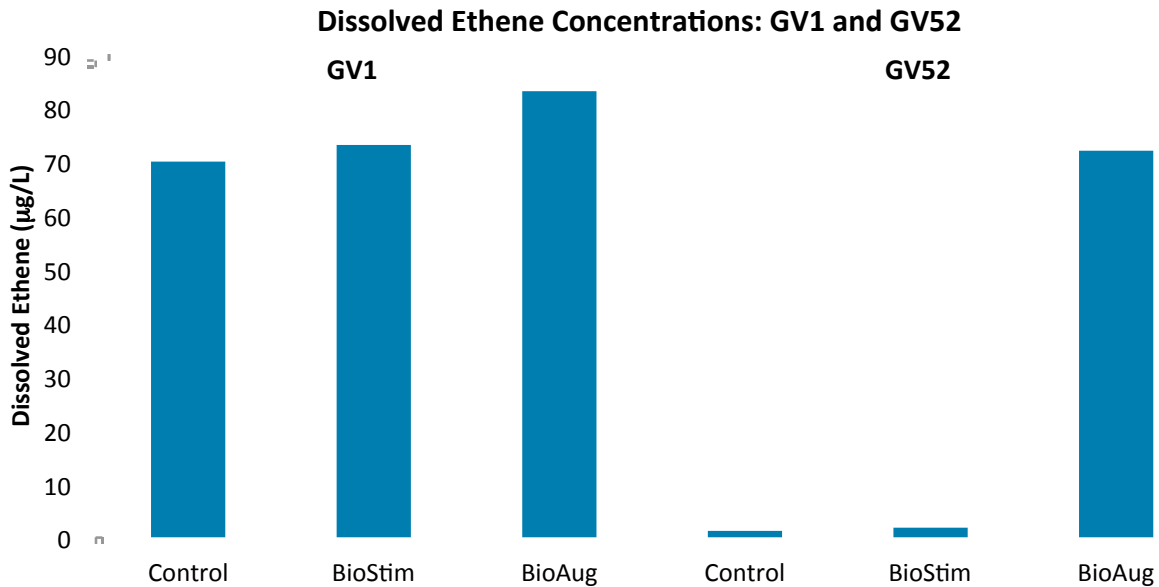


Figure 2. Dissolved ethene concentrations for each Bio-Trap *In Situ* Microcosm following deployment.

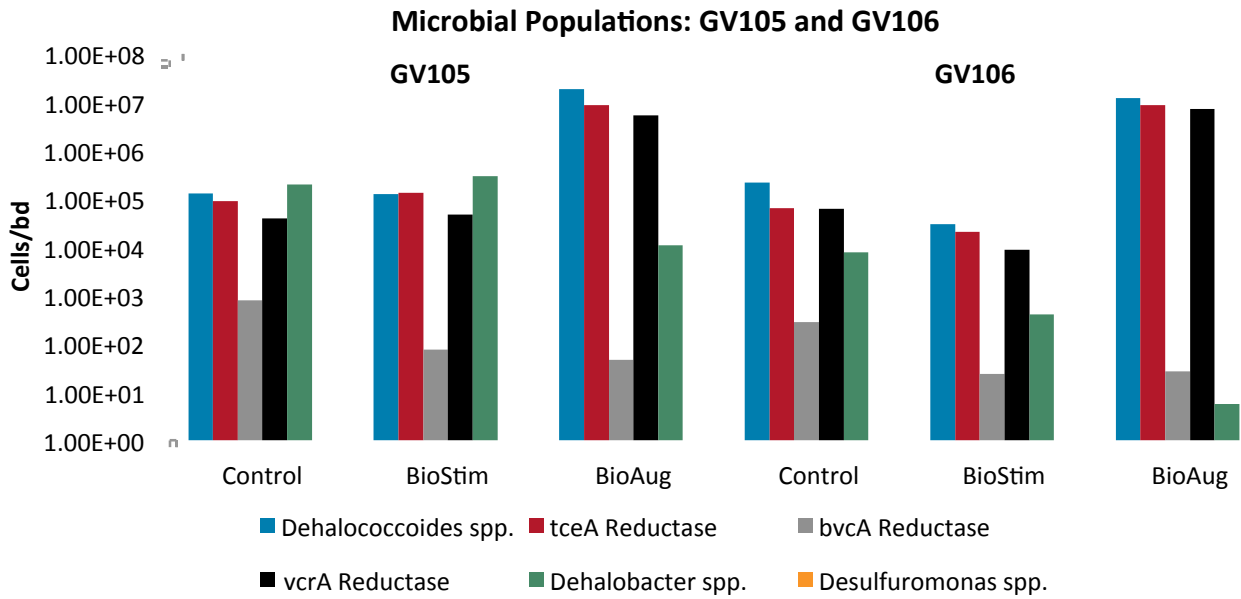


Figure 2. CENSUS® results for MICRO samplers deployed in each Bio-Trap *In Situ* Microcosm.

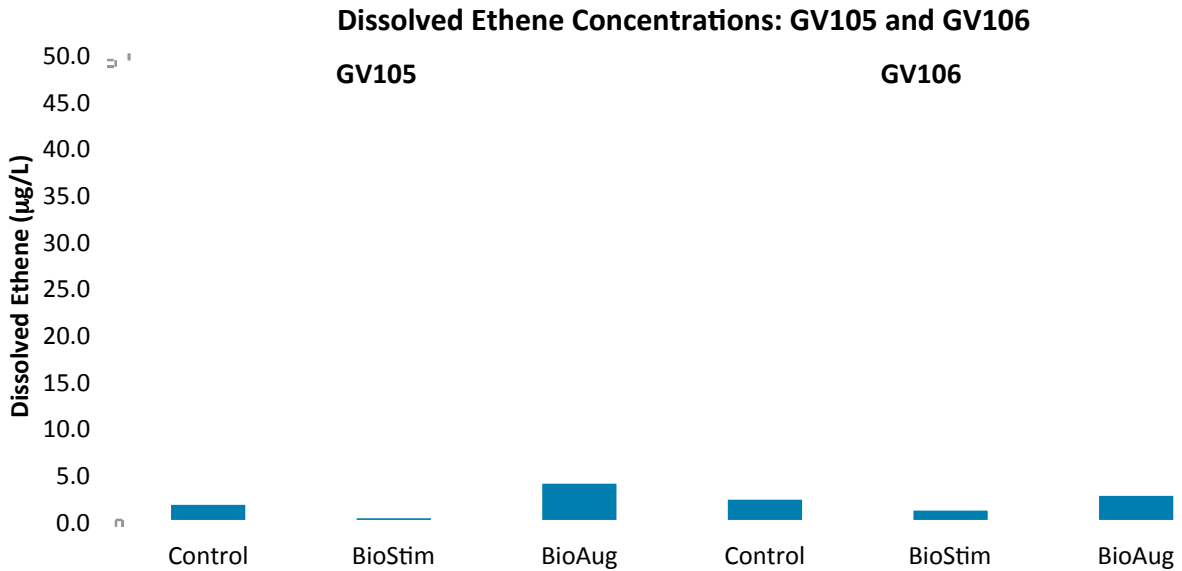


Figure 2. Dissolved ethene concentrations for each Bio-Trap *In Situ* Microcosm following deployment.

Interpretation

Bio-Trap® *In Situ* Microcosm studies are designed to provide the chemical, geochemical, and microbiological lines of evidence required to evaluate remediation options in a single, cost-effective field study. To aid in the decision making process, comparisons should generally focus on differences in results between *In Situ* Microcosm units. For example, comparison of the *Dehalococcoides* populations in the Control and BioStim units can be used to assess whether electron donor addition would stimulate growth of this key group of halorespiring bacteria. While results for individual analyses should be compared between units, overall interpretation should integrate all lines of evidence with due consideration of site conditions, site activities, and the desired treatment mechanism. The following discussion describes interpretation of results in general terms and is meant to serve as a guide.

Microbial Populations: CENSUS® analysis allows site managers to quantify targeted members of the microbial community deemed critical for site remediation. Total Eubacteria provides an index of the total bacterial biomass and is generally greater than 10^6 cells/bead in the absence of factors inhibiting microbial growth. While a number of bacterial cultures capable of utilizing PCE and TCE as growth supporting electron acceptors have been isolated¹⁻⁵, *Dehalococcoides* spp. may be the most important because they are the only bacterial group that has been isolated to date which is capable of complete reductive dechlorination of PCE to ethene⁶. In fact, the presence of *Dehalococcoides* spp. has been associated with the full dechlorination to ethene at sites across North America and Europe⁷. Thus, CENSUS® quantification of *Dehalococcoides* in each Bio-Trap *In Situ* Microcosm unit can be used to evaluate the likelihood of complete reductive dechlorination of PCE and TCE under MNA conditions, the ability of electron donor addition alone to stimulate growth of halorespiring bacteria (BioStim), and the survival of commercial *Dehalococcoides* cultures in the field (BioAug). The accumulation of the daughter products *cis*-DCE and vinyl chloride termed “DCE stall” is relatively common at PCE/TCE sites especially under MNA conditions. Accumulation of vinyl chloride, generally considered more carcinogenic than the parent compounds, is particularly problematic. CENSUS® quantification of vinyl chloride reductase genes (*bvcA* and *vcrA*) was developed to more definitively confirm the potential for biodegradation of vinyl chloride. Again, comparison of vinyl chloride reductase copies between units can be used to assess the efficacy of enhanced bioremediation approaches (biostimulation and bioaugmentation) to enhance populations of organisms specifically capable of reductive dechlorination of vinyl chloride.

Dissolved Gases: When comparing concentrations of dissolved gases between *In Situ* Microcosm units, particular care should be afforded to the dissolved ethene concentration. While ethene can volatilize, can be further metabolized, or be further reduced to ethane in some environments, greater concentrations of ethene generally indicate complete reductive dechlorination of PCE and TCE. In addition to quantifying the end products of reductive dechlorination, analysis of dissolved gases includes determination of dissolved methane. Combined with results of geochemical analysis (See Anions), elevated methane concentrations are indicative of highly reducing conditions conducive to reductive dechlorination. However, methanogens also compete with dechlorinating bacteria including *Dehalococcoides* for available hydrogen.

Anions: Although increases in chloride ion concentrations are often coupled with reductive dechlorination and daughter product formation, the main purpose of the GEO sampler is to measure concentrations of competing electron acceptors and assess the redox status. Elevated concentrations of nitrate, for example, would suggest anoxic conditions less conducive to reductive dechlorination. Production of ferrous iron combined with elevated sulfate concentrations generally indicates iron reducing conditions. Lower concentrations of sulfate combined with sulfide production (but low methane production) suggests sulfate reducing conditions. The production of methane (Table 1 - dissolved gases) suggests highly reducing, methanogenic conditions. While dechlorination of TCE to *cis*-DCE occurs under iron reducing conditions (and in more strongly reducing environments), further reduction to vinyl chloride and ethene may require more anaerobic conditions (sulfate reduction and methanogenesis).

Glossary

Amendment Supplier: a component that fits inside the MICRO-Trac/Bio-Trap unit at the bottom. This component is designed to slowly diffuse a desired amendment within a BioStim and/or a BioAug Unit during the incubation time.

Sampler: Individual components consisting either of a geochemical (GEO), contaminant of concern (COC) or microbial (MICRO) sampler. Geochemical samplers are essentially VOA vials with special septa that facilitate transfer. The microbial samplers are made from a smaller PVC pipe ~1" x 3 1/2" and contains Bio-Sep® beads which serve as a microbial growth matrix.

COC Sampler: 40 mL amber VOA with a low density polyethylene membrane permitting passive diffusion of volatile organic compounds (VOCs).

GEO Sampler: a 20 mL amber VOA with a nylon based membrane permitting passive diffusion of anionic species.

MICRO Sampler: a polyvinylchloride cassette containing Bio-Sep® beads which provide a large surface area for microbial growth. In addition to a matrix for microbial growth, the Bio-Sep® beads can be "baited" with amendments including ¹³C labeled chlorobenzene as used in this study. Bio-Sep® beads were designed to allow extraction of phospholipids fatty acids and DNA for analysis of microbial communities.

Unit: 1.25" x 15" PVC housing that all of the samplers are place into for deployment. Units will have baffled end caps to separate different zones within the monitoring well. Typically each unit will correspond to a treatment approach.

Assembly: Collections of Units for a particular monitoring well. Samplers (GEO, COC, and MICRO) are placed in each unit. Units are linked to form an Assembly. An entire Assembly (consisting of multiple units) is deployed in each well.

CENSUS: CENSUS is based on a technique called quantitative polymerase chain reaction (qPCR) whereby many copies of a specific gene are generated. As each gene copy is made, a fluorescent marker is released, measured, and used to quantify the number of target genes present in a sample.

References

1. Gerritse, J., V. Renard, T. M. Pedro Gomes, P. A. Lawson, M. D. Collins, and J. C. Gottschal. 1996. "*Desulfitobacterium* sp. Strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols." Archives of Microbiology 165(2): 132-140.
2. Gerritse, J., O. Drzyzga, G. Kloetstra, M. Keijmel, L. P. Wiersum, R. Hutson, M. D. Collins, and J. C. Gottschal. 1999. "Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1." Applied and Environmental Microbiology 65(12): 5212-5221.
3. Holliger, C., G. Schraa, A.J.M. Stams, and A.J.B. Zehnder. 1993. "A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth." Applied and Environmental Microbiology 59 (9): 2991-2997.

4. Krumholz, L. R., R. Sharp, and S. S. Fishbain. 1996. "A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation." *Applied and Environmental Microbiology* 62(11): 4108-4113.
5. Löffler, F.E., R.A. Sanford, and J.M. Tiedje. 1996. "Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23." *Applied and Environmental Microbiology* 62(10): 3809-3813.
6. Maymó-Gatell, X., T. Anguish, and S.H. Zinder. 1999. "Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes* 195." *Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 3108-3113.
7. Hendrickson, E.R., J. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis, and R.C. Eversole. 2002. "Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe." *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 485-495.
8. Maymo-Gatell, X. 1997. "*Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195, A novel eubacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene (PCE) to ethene." Report No. AL/EQ-TR-1997-0029.
9. Gerritse et al. 1999. "Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1." *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5212-5221.
10. Suyama et al. 2001. "Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65(7): 1474-1481.

Bilaga 9

Laboratory Results





Client Name: WSP Environment & Energy
Contact: Lars Davidsson
Address: Laholmsvagen 10
Halmsted, . 30248
Sweden

Page: Page 1 of 8
Lab Proj #: P1210004
Report Date: 11/07/12
Client Proj Name: Fagerhult
Client Proj #: 10169349

Laboratory Results

Total pages in data package: 9

<u>Lab Sample #</u>	<u>Client Sample ID</u>
P1210004-01	GV1
P1210004-02	GVK6
P1210004-03	GVK8
P1210004-04	GVK17
P1210004-05	GV52
P1210004-06	GV25
P1210004-07	GV105

Microseeps test results meet all the requirements of the NELAC standards or provide reasons and/or justification if they do not.

Approved By: Robin Robl **Date:** 11/7/12

Project Manager: Robbin Robl

The analytical results reported here are reliable and usable to the precision expressed in this report. As required by some regulating authorities, a full discussion of the uncertainty in our analytical results can be obtained at our web site or through customer service. Unless otherwise specified, all results are reported on a wet weight basis.

*As a valued client we would appreciate your comments on our service.
Please call customer service at (412)826-5245 or email customerservice@microseeps.com.*

Case Narrative:

Microseeps, Inc.
 220 William Pitt Way
 Pittsburgh, PA 15238
 phone: 412-826-5245

CSIA Report

6-Nov-12
 P1210004
 WSP Environment & Energy
 Client Project Name: Fagerhult
 Client Project #: 10169349

Lab ID		Concentration				CSIA (Carbon)					
		Sample		PQL		Area		Co-elution	Analysis	Date	Delta (%)
		Sample	55	5	10/13/12	7.78	1				
P1210004-01	GV1	2500	500	10/16/12	44.7	1	No	3650	11/2/12	-17.59	
P1210004-02	GVK6	520	50	10/19/12	15.0	1	No	3651	11/2/12	-27.27	
P1210004-03	GVK8	14	5	10/16/12	2.65	1	No	3653	11/2/12	-17.82	
P1210004-04	GVK17	1300	500	10/16/12	2.74	1	No	3654	11/3/12	-20.08	
P1210004-05	GV52	150	5	10/13/12	34.6	1	No	3656	11/3/12	-10.46	
P1210004-06	GV25	140	5	10/13/12	49.2	1	No	3657	11/3/12	-11.20	
P1210004-07	GV105	-	-	-	2.87	1	No	3515	10/27/12	-18.71	
Duplicate	GV52	0	-	-	< 1 (U)	1	No	3660	11/3/12	-	
Blank	-	10	-	-	1.34	1	No	3661	11/3/12	-29.06	
LCS_Lo	-	50	-	-	14.2	1	No	3662	11/3/12	-28.54	
LCS_Hi	-	-29.153 <=>									
LCS acceptance range											

Method	8260B	AM-24-AR_C	AM-24-DL_C
Units	ug/l	Vs	% _{oo} , VPDB
Analyst	CS	AK	AK

Microseeps, Inc.
 220 William Pitt Way
 Pittsburgh, PA 15238
 phone: 412-826-5245

CSIA Report

6-Nov-12
 P1210004
 WSP Environment & Energy
 Client Project Name: Fagerhult
 Client Project #: 10169349

cis-Dichloroethene		Concentration				CSIA (Carbon)					
		(ug/l)		Area		Co-elution		Analysis		Date	Delta (‰)
		Sample	PQL	Date	Sample	PQL	No	Yes	Analysis		
Lab ID	Client ID	Sample	PQL	Date	Sample	PQL	Co-elution	Analysis	Date	Delta (‰)	
P1210004-01	GV1	14	5	10/13/12	2.11	1	No	3648	11/2/12	-8.04	
P1210004-02	GVK6	1600	50	10/16/12	23.0	1	No	3650	11/2/12	-6.56	
P1210004-03	GVK8	630	50	10/19/12	21.1	1	No	3651	11/2/12	-9.20	
P1210004-04	GVK17	<5	5	10/16/12	< 1 (U)	1	No	3653	11/2/12	-	
P1210004-05	GV52	740	500	10/16/12	2.63	1	No	3654	11/3/12	-13.67	
P1210004-06	GV25	24	5	10/13/12	4.58	1	No	3656	11/3/12	-4.50	
P1210004-07	GV105	30	5	10/13/12	8.40	1	No	3657	11/3/12	-6.82	
Duplicate	GV52	-	-	-	2.99	1	No	3515	10/27/12	-13.99	
Blank	-	0	-	-	< 1 (U)	1	No	3660	11/3/12	-	
LCS_Lo	-	50	-	-	19.1	1	No	3661	11/3/12	-23.06	
LCS_Hi	-	200	-	-	82.5	1	No	3662	11/3/12	-23.31	
LCS acceptance range										-22.24 <=> -23.24	

Method	8260B	AM-24-AR_C	AM-24-DL_C
Units	ug/l	Vs	%o, VPDB
Analyst	CS	AK	AK

Microseeps, Inc.
 220 William Pitt Way
 Pittsburgh, PA 15238
 phone: 412-826-5245

CSIA Report

6-Nov-12
 P1210004
 WSP Environment & Energy
 Client Project Name: Fagerhult
 Client Project #: 10169349

Trichloroethene		Concentration				CSIA (Carbon)				
		(ug/l)		Area		Co-elution	Analysis	Date	Delta (‰)	
		Sample	PQL	Date	Sample					PQL
P1210004-01	GV1	5	5	10/13/12	< 1 (U)	1	No	3648	11/2/12	-
P1210004-02	GVK6	220	50	10/16/12	3.81	1	No	3650	11/2/12	-7.18
P1210004-03	GVK8	24	5	10/13/12	2.99	1	No	3652	11/2/12	-8.56
P1210004-04	GVK17	<5	5	10/13/12	< 1 (U)	1	No	3653	11/2/12	-
P1210004-05	GV52	160	5	10/13/12	21.8	1	No	3655	11/3/12	-6.98
P1210004-06	GV25	<5	5	10/13/12	< 1 (U)	1	No	3656	11/3/12	-
P1210004-07	GV105	<5	5	10/13/12	< 1 (U)	1	No	3657	11/3/12	-
Duplicate	GV52	-	-	-	< 1 (U)	1	No	3515	10/27/12	-
Blank	-	0	-	-	< 1 (U)	1	No	3660	11/3/12	-
LCS_Lo	-	50	-	-	15.9	1	No	3661	11/3/12	-30.23
LCS_Hi	-	200	-	-	66.2	1	No	3662	11/3/12	-30.52
LCS acceptance range										-30.283 <=>

Method	8260B	AM-24-AR_C	AM-24-DL_C
Units	ug/l	Vs	% VPDB
Analyst	CS	AK	AK

Microseeps, Inc.
 220 William Pitt Way
 Pittsburgh, PA 15238
 phone: 412-826-5245

CSIA Report

6-Nov-12
 P1210004
 WSP Environment & Energy
 Client Project Name: Fagerhult
 Client Project #: 10169349

1CP (Surrogate)		CSIA (Carbon)							Delta (‰)
Lab ID	Client ID	Sample Collection	Area	Dilution	PQL	Co-elution	Analysis	Date	
P1210004-01	GV1	10/02/12	13.0	1	1	No	3648	11/02/12	-37.58
P1210004-02	GVK6	10/02/12	14.8	10	1	No	3650	11/02/12	-37.29
P1210004-03	GVK8	10/02/12	13.9	10	1	No	3651	11/02/12	-37.16
P1210004-03	GVK8	10/02/12	14.7	1	1	No	3652	11/02/12	-37.75
P1210004-04	GVK17	10/02/12	13.5	1	1	No	3653	11/02/12	-37.62
P1210004-05	GV52	10/02/12	12.6	100	1	No	3654	11/03/12	-37.32
P1210004-05	GV52	10/02/12	18.2	1	1	Yes	3655	11/03/12	-34.34
P1210004-06	GV25	10/02/12	15.4	1	1	No	3656	11/03/12	-37.46
P1210004-07	GV105	10/02/12	15.6	1	1	No	3657	11/03/12	-37.81
Duplicate	GV52	10/02/12	36.3	100	1	No	3515	10/27/12	-37.16
Blank	-	-	17.2	1	1	No	3660	11/03/12	-37.10
LCS_Lo	-	-	12.7	1	1	No	3661	11/03/12	-37.17
LCS_Hi	-	-	13.1	1	1	No	3662	11/03/12	-37.72
Surrogate acceptance range							-36.37	<=>	-37.37

Method	AM-24-AR_C	AM-24-DL_C
Units	Vs	%o, VPDB
Analyst	AK	AK

Case Narrative: The blank, LCS's, duplicate and surrogates were all close to or within the acceptance range and the data is reported as valid and representative of the samples as received.



Microseeps
Lab. Proj. #

1216004

CHAIN - OF - CUSTODY RECORD

Microseeps
COC cont. #

Phone: (412) 826-5245

Microseeps, Inc. - 220 William Pitt Way - Pittsburgh, PA 15238

Fax No.: (412) 826-3433

Company: WSP Environmental

Co. Address:

Phone #: +46352217 YS Fax #: +4635221701

Proj. Manager: LARS DAVIDSON

Proj. Name/Number: 10169349

Sampler's signature: _____

Results to:

Invoice to:

Sample ID	Sample Description	Sample Type		Date	Time	# Bottles	Cooler Temp.	Parameters Requested	Remarks
		Water	Vapor/Solid						
GVI		X		2 Oct 2012		9		VC COCF TCF	
GVK6		X				9			
GVK8		X				9			
GVK17		X				9			
GV52		X				9			
GV25		X				9			
GV105		X				9			

Relinquished by:	Company:	Date:	Time:	Received by:	Company:	Date:	Time:
Relinquished by:	Company:	Date:	Time:	Received by:	Company:	Date:	Time:
Relinquished by:	Company:	Date:	Time:	Received by:	Company:	Date:	Time:

Cooler Receipt Form

Client Name: WSP Project: 10169349 Lab Work Order: P1210009

A. Shipping/Container Information (circle appropriate response)

Courier: FedEx UPS USPS Client Other: _____ Air bill Present: Yes No

Tracking Number: 799094899808

Custody Seal on Cooler/Box Present: Yes No Seals Intact: Yes No

Cooler/Box Packing Material: Bubble Wrap Absorbent Foam Other: _____

Type of Ice: Wet Blue None Ice Intact: Yes Melted

Cooler Temperature: 15.4°C Radiation Screened: Yes No Chain of Custody Present: Yes No

Comments: _____

B. Laboratory Assignment/Log-in (check appropriate response)

	YES	NO	N/A	Comment Reference non-Conformance
Chain of Custody properly filled out		<input checked="" type="checkbox"/>		
Chain of Custody relinquished		<input checked="" type="checkbox"/>		
Sampler Name & Signature on COC		<input checked="" type="checkbox"/>		
Containers intact		<input checked="" type="checkbox"/>		
Were samples in separate bags	<input checked="" type="checkbox"/>			
Sample container labels match COC Sample name/date and time collected	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Sufficient volume provided	<input checked="" type="checkbox"/>			
Microseeps containers used	<input checked="" type="checkbox"/>			
Are containers properly preserved for the requested testing? (as labeled)	<input checked="" type="checkbox"/>			
If an unknown preservation state, were containers checked? Exception: VOA's coliform			<input checked="" type="checkbox"/>	
Was volume for dissolved testing field filtered, as noted on the COC? Was volume received in a preserved container?			<input checked="" type="checkbox"/>	

Comments: _____

Cooler contents examined/received by: HLG Date: 10-5-12

Project Manager Review: PJR Date: 10-8-12

NON-CONFORMANCE FORM

Microseeps Project Number: P1210004

Date: 10-5-12 Time of Receipt: 11:00 Receiver: HLG

Client WSP

REASON FOR NON-CONFORMANCE:

1. COC was not relinquished by Client.
2. Temp. upon receipt was 15.4°C. Blue ice melted.
3. No time of collection on COC & vials. Date taken from COC.
4. GV 105: one vial broken; 8 left for analysis

ACTION TAKEN:

Client name: Lars Davidsson Date: 10/5/12 Time: email

1, 2 and 3 - Client notified - OK to proceed

4.1 OK to proceed. - client notified.

Customer Service Initials: RL

Date: 10/5/12

Robbin Robl

From: Robbin Robl
Sent: Friday, October 05, 2012 4:03 PM
To: Davidsson, Lars (lars.davidsson@WSPGroup.se)
Subject: CSIA Samples Received

Hello Lars!

We received your samples today for CSIA analysis. I did receive a non-conformance for some minor problems with the samples that I need to make you aware of.

- 1.) The chain of custody was not relinquished.
- 2.) The temperature upon receipt was 15.4°C – all of the blue ice had melted in transit.
- 3.) The collection date was not indicated on the vials and was taken from the chain of custody for reporting purposes.
- 4.) Sample ID GV105 was received with one broken vial leaving 8 vials for analysis.

I have noted that everything is OK to proceed for this project. We will be able to analyze sample GV105 with 8 vials – I have confirmed this with our CSIA manager.

Please let me know if you have any questions.

Thank you!

Robbin

Robbin Robl

Microseeps, Inc.

220 William Pitt Way

Pittsburgh, PA 15238

Direct: 412-826-4483

Office: 412-826-5423

Disclaimer: This message contains confidential information and is intended only for the individual(s) named. If you are not the named addressee, you should permanently delete this e-mail from your system and should not disseminate, distribute or copy this e-mail. E-mail transmission cannot be guaranteed to be secure or error-free as information delivered over the internet could be corrupted, lost, destroyed, delayed, or contain viruses.



Statens geotekniska institut

Postadress: 581 93 Linköping

Tel: 013-20 18 00

E-post: sgi@swedgeo.se

www.swedgeo.se
