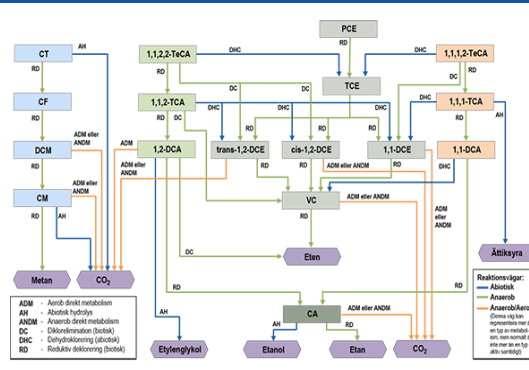
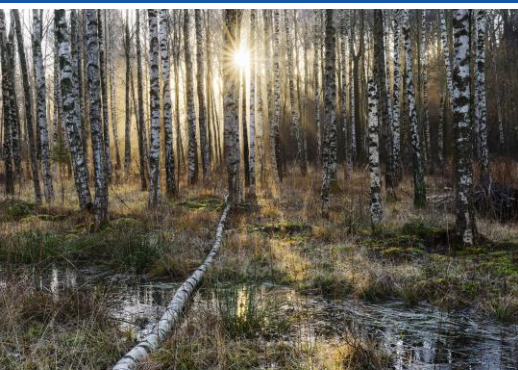


Förstärkt mikrobiell självrening av klorerade lösningsmedel



SGI Publikation 37

Hänvisa till detta dokument på följande sätt:
SGI 2017, *Förstärkt mikrobiell självrening av klorerade lösningsmedel*, SGI Publikation 37, Statens geotekniska institut, Linköping.

Diarienummer: 1.1-1201-0064

Uppdragsnummer: 14717

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

Bilder på omslaget: Mikael Svensson/Scandinav Bildbyrå (vänster), SGI (mitten), Cultura Creative/Johnér Bildbyrå (höger).



Statens geotekniska institut

Förstärkt mikrobiell självrening av klorerade lösningsmedel

SGI Publikation 37

Linköping 2017



Förord

Föroreningar kan medföra risker för människors hälsa och vår miljö. I Sverige har vi miljökvalitetsmål som anger inriktningen för miljöarbetet och fokuserar på 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 gällande förorenade områden. Syftet är att SGI ska medverka till att höja kunskapsnivån och öka saneringstakten så att miljökvalitetsmålen nås. Som ett led i detta ingår att förmedla kunskap om det arbete som utförs vid SGI till olika intressenter, såsom tillsynsmyndigheter, konsulter och problemägare. Detta görs bland annat genom att ge ut SGI Publikationer.

Åtskilliga områden i Sverige bedöms vara förorenade med klorerade lösningsmedel, t.ex. i anslutning till kemtvättar eller metallbearbetningsindustrier. Sanering av klorerade lösningsmedel kan bl.a. ske genom olika typer av kemiska och/eller biologiska metoder som bryter ner föroreningarna.

I publikationen beskrivs viktiga principer för nedbrytning av klorerade lösningsmedel, lämpliga metoder för att utvärdera nedbrytningsförloppet samt rekommendationer för design av åtgärd. Särskilt fokus riktas mot metoden biostimulering som är en typ av förstärkt mikrobiell självrening. Den innebär att man stimulerar den naturliga nedbrytningen genom tillsats av kolkälla. Metoden kan kompletteras med bioaugmentation, då man även tillsätter speciellt utvalda mikroorganismer.

Arbetet med publikationen har genomförts av SGI. Flera har bidragit på olika sätt i detta arbete; Lennart Larsson, Helena Branzén och Märta Ländell. Lennart Larsson har skrivit publikationen och Märta Ländell har utfört teknisk granskning.

Publikationen baseras på litteraturstudier samt praktiska erfarenheter från ett pilotförsök vid Tvätteriet Alingsås som drivits av SGI med Helena Branzén som uppdragsledare. Publikationen är indelad i en huvudrapport, en rapportbilaga och en referensbilaga. Innehållet i huvudrapporten är på en allmän nivå. Rapportbilagan ger fördjupad information om viktiga faktorer och strategier att beakta vid mikrobiellt baserade åtgärder vid akvifärer som förorenats av klorerade lösningsmedel.

Synpunkter på publikationen har inhämtats genom ett remissförfarande. Ett utkast har skickats för synpunkter till Naturvårdsverket, Sveriges geologiska undersökning, Länsstyrelsen Skåne, Länsstyrelsen Västra Götaland, Länsstyrelsen Östergötland, länsstyrelsernas tillsynsamordnare samt WSP Sverige AB, SWECO och NIRAS Sverige AB. Inkomna synpunkter har beaktats vid färdigställande av denna publikation.

Undertecknad har beslutat att ge ut publikationen.

Linköping i september 2017

Mikael Stark
Chef Markmiljöavdelningen

Innehållsförteckning

Sammanfattning	8
Summary	8
1. Inledning	9
1.1 Syfte och mål	10
1.2 Läsanvisning	10
2. Avgränsningar	11
3. Några övergripande förutsättningar	12
3.1 Klorerade lösningsmedel	12
3.2 Mikrobiell nedbrytning	13
3.3 Geokemiska förhållanden	13
4. Nedbrytning av klorerade lösningsmedel	17
4.1 Inledning	17
4.2 Mikrobiell nedbrytning	18
4.3 Redoxförhållanden	19
4.4 Reduktiv deklorering	20
4.5 Oxidativ nedbrytning	25
5. Analyser, utvärderingar, kostnader	28
5.1 Kemiska analyser och indikatorer	28
5.2 Mikrobiella analyser och indikatorer	33
6. Biokemisk guide för beslut om biostimulering och bioaugmentation ..	41
6.1 Inledning	41
6.2 Flödesschema	42
6.3 Kemiska frågor och svar	43
6.4 Mikrobiella frågor och svar	46
6.5 Övrigt kemiskt-biologiskt	47
7. Rekommendationer och slutsatser	49
7.1 Lab-/pilot-/fälttesters påverkan på resultat i fullskala	49
7.2 Saneringstid med biostimulering och bioaugmentation	49
7.3 Val av substrat	50
7.4 Mobilitet och spridning	51
7.5 Kontroll av metan och svavelväte	51
7.6 Slutsatser	52
8. Ordlista	53

Bilagor

1. Fördjupad information: Mikroorganismer, reduktiv – oxidativ nedbrytning, bio-stimulering/augmentation
2. Referenser

Sammanfattning

Åtskilliga områden i Sverige bedöms vara förorenade med klorerade lösningsmedel som är toxiska för människa och miljö. I begreppet klorerade lösningsmedel ingår bl.a. klorerade etener, t.ex. perkloreten och trikloreten. Dessa är starkt förknippade med förorening från kemtvättar samt mekaniska industrier. Föroreningarna går att bryta ned med mikrobiella metoder men för att resultatet ska bli lyckat krävs goda mikrobiella och kemiska kunskaper. Vid många svenska saneringar av akvifärer som förorenats av kemtvättar har man använt sig av biostimulering, som är en typ av förstärkt mikrobiell självrening. Biostimulering innebär att man genom tillsats *in situ* av kolkälla stimulerar den naturliga nedbrytningen. En kompletterande teknik är bioaugmentation varvid man tillsätter speciellt utvalda mikroorganismer. Bioaugmentation är en etablerad teknik i t.ex. USA, men har hittills bara använts vid enstaka förorenade objekt i Sverige.

Denna publikation förklarar varför det ibland krävs en kombination av biostimulering och bioaugmentation för att saneringen ska bli lyckad. I publikationen beskrivs hur man undersöker om det finns behov av att kombinera metoderna samt hur de båda åtgärdsmetoderna kan utföras i fullskala.

Publikationen baseras på omfattande studier av främst utländsk litteratur, listade i en separat Bilaga. Textinnehållet i publikationen exemplifieras delvis med diagram vars underliggande data är hämtade från erfarenheter erhållna i ett projekt utfört i pilotskala, i en kloretenförorenad akvifär vid Alingsås tvätterier.

Summary

Numerous sites in Sweden are contaminated with chlorinated solvents that are toxic to humans and the environment. Chlorinated solvents include for example tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE). These are strongly associated with contamination from dry cleaners and mechanical industries. The pollutants can be degraded using microbial methods but for the result to be successful, good microbial and chemical knowledge is required. In many Swedish remediation projects that have focused on aquifers contaminated of spill from dry cleaner activities, biostimulation has been used, which is a type of enhanced microbial self-remediation (enhanced natural attenuation). By biostimulation natural carbon sources are added to the contaminated aquifer to stimulate the natural biodegradation of the contaminant. An important complementary method is bioaugmentation by which special selected microorganisms are added. The combination is established for example in USA but has so far only been tested at a very few contaminated sites in Sweden.

This publication explains why a combination of biostimulation and bioaugmentation can be necessary for the remediation to be successful. The publication describes how to investigate whether there is a need to combine the methods and how such combination can be performed in full scale.

The publication is based on extensive studies of mainly foreign literature, listed in a separate Annex. The text content of the publication is exemplified in part with diagram whose underlying data is derived from experiences obtained in a project conducted in pilot scale, in a PCE polluted aquifer at a dry cleaner facility in Alingsås, Sweden.

1. Inledning

Under de senaste decennierna har mikroorganismers förmåga att bryta ned föroreningar fått ökad användning vid efterbehandling av förorenade markområden. Det gäller inte minst s.k. mikrobiell reduktiv deklorering för sanering av akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel, framför allt klorerade etener. Dessa ämnen har spridits till miljön främst från kemtvättar och verkstäder för metallbearbetning.

Åtgärdsmetoder som baseras på mikrobiell reduktiv deklorering har inte alltid uppnått acceptabel haltreduktion inom acceptabel tid. Utförandet kan liknas vid en högteknologisk biokemisk process-industri där varje process är platsspecifik och kräver sin unika lösning. Detta kräver både aktuell vetenskaplig och ingenjörsmässig kunskap inom flera ämnesområden såsom mikrobiologi, kemi och hydrogeologi.

Med **förstärkt mikrobiell självrening** menas åtgärder som förstärker/stimulerar det naturliga mikrobiella nedbrytningsförloppet av en förorening. För de allra flesta klorerade lösningsmedel stimuleras de mikroorganismer som använder reduktiv deklorering som nedbrytningsmetod.

Nyttjandet av fullskalig förstärkt mikrobiell reduktiv deklorering av klorerade lösningsmedel var tidigare enbart inriktad på stimulerad nedbrytning genom tillsats *in situ* av någon lämplig fermenterbar kolkälla, s.k. **biostimulering**. Saneringsresultaten varierade; ofta stannade nedbrytningen vid *cis*-DCE och vinylklorid (VC). Detta ”stopp” i nedbrytningsprocessen kallas stallning och innebär att koncentrationen av lågklorerade produkter ökar. Detta gav metoden dåligt rykte. Den utvecklades dock till att även innefatta tillsats *in situ* av speciellt utvalda mikroorganismer/bakterier, s.k. **bioaugmentation**. Dessa organismer, kallade *Dehalococcoides* (*Dhc*), upptäcktes för några tiotal år sedan i ett PCE-förorenat område i Kanada. Efter att man funnit att de inte var patogena för människan selekterades, upparbetades och uppkoncentrerades de för första gången för drygt 10 år sedan. De har sedan kommit till stor användning vid behandling av kloretenförorenade akvifärer internationellt. Detta har resulterat i en mer fullständig deklorering av kloretenförorenade akvifärer, varvid alla kloreten, inklusive DCE och VC, kunnat brytas ned mikrobiellt till icke-toxiska icke-klorerade produkter, t.ex. eten. Både biostimulering och bioaugmentation beskrivs översiktligt i efterföljande kapitel samt mer ingående i Bilaga 1. Förklarande ordlista ges i Kapitel 8.

I bl.a. USA är åtgärder där biostimulering kombineras med bioaugmentation en etablerad teknik. Där hade man redan fram till 2009 utfört bioaugmentation med *Dhc* för deklorering av klorerade lösningsmedel på ca 300 förorenade platser i över trettio delstater (Lyon och Vogel, 2013).

I Danmark går utvecklingen idag mot att kombinera biostimulering och bioaugmentation redan vid uppstart av saneringar av akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel. Man motiverar detta med att merkostnaden för bioaugmentationen är relativt låg (Avsnitt 5.2.3 samt Bilaga 1, Avsnitt 3.5) och att man blir mer säker på att saneringsförloppet kommer igång omedelbart, inklusive deklorering av de lågklorerade etenerna (DCE och VC). Dessutom vill man undvika att enbart biostimulering i efterhand visar sig vara otillräcklig och att man därför ändå måste tillsätta bakterier i slutänden (dvs. bioaugmentation).

I Sverige är fullskalaåtgärder med en kombination av biostimulering och bioaugmentation med *Dhc* fortfarande (år 2016) en i huvudsak outnyttjad teknik. I de fall man använt sig av förstärkt reduktiv deklorering så har det, med få undantag, enbart innefattat biostimulering. Resultaten har varierat, men man har ofta fått en ofullständig deklorering. Några få pilottester har dock genomförts med bioaugmentation med *Dhc* (t.ex. NSD, 2013). I ett pilottest i Alingsås (Branzén och Ländell, 2017)

visades att kombinationen var både nödvändig och lyckad för att påskynda fullständig deklorering till eten.

1.1 Syfte och mål

Det finns idag omfattande svensk kunskap om klorerade lösningsmedels egenskaper, spridnings-sätt, riskbedömning och åtgärdsmetoder. Däremot saknas information om viktiga kemiska och mikrobiella faktorer och hur de kan undersökas, utvärderas, nyttjas och optimeras för att mikrobiell efterbehandling av klorerade lösningsmedel med kombinationen biostimulering och bioaugmentat-ion ska lyckas. Det är speciellt viktigt att förstå vad som styr nedbrytningsprocessen, hur mikroorg-anismerna fungerar och hur olika kemiska parametrar påverkar processen.

Syftet med rapporten är att den ska ge fördjupad ingenjörsmässig biokemisk kunskap inför plane-ring och genomförande av sanering. Målsättningen är att rapporten ska ge stöd åt myndigheter, länsstyrelser, kommuner, konsulter och entreprenörer och genom detta bidra till en ökad använd-ning av förstärkt mikrobiell självrening som åtgärdsmetod.

1.2 Läsanvisning

Publikationen är indelad i en huvudrapport, en fördjupningsbilaga och en referensbilaga.

Huvudrapporten inleds med några övergripande förutsättningar för mikrobiell nedbrytning av klo- rerade lösningsmedel (Kapitel 3). Detta följs av Kapitel 4 som beskriver hur klorerade lösningsme- del, framför allt klorerade etener, bryts ned reduktivt och oxidativt med och utan mikroorganismer. I Kapitel 5 beskrivs analyser, kostnader och hur resultaten från analyserna kan utvärderas. Kapitel 6 innehåller kemiska och mikrobiella frågor och svar som kan guida läsaren till ett optimalt utförande av förstärkt naturlig självrening av klorerade lösningsmedel. I Kapitel 7 ges några generella re- kommendationer inför nyttjandet av mikrobiell nedbrytning av klorerade lösningsmedel. I Kapitel 8 ges en förklarande ordlista för de vanligast förekommande uttrycken.

Bilaga 1 är avsedd för den läsare som önskar få en djupare förståelse för de bakomliggande faktorer som gör saneringar av kloretenförorenade akvifärer lyckade. Bilagan inleds med information om de unika mikroorganismer som måste finnas i akvifären för att fullständig mikrobiell nedbrytning av klorerade etener, inklusive vinylklorid, ska kunna ske. Detta följs av information som ingående beskriver mikrobiella metabola och cometabola nedbrytnings-sätt, kopplade till reduktiv deklorering och oxidativ nedbrytning. I Bilagans Kapitel 3 ges en fördjupning av begreppen biostimulering och bioaugmentatation med fokus på deras fullskaliga nyttjande. Bilaga 1 avslutas med ett reaktions- schema som visar olika reaktionsvägar och reaktionssätt för nedbrytning av de flesta klorerade lösningsmedel. I Bilaga 2 redovisas referenser från huvudrapport och Bilaga 1.

2. Avgränsningar

Med klorerade lösningsmedel menas i denna publikation en grupp av föreningar bestående av klorerade alifater med maximalt två kloratomer. Främst avses den industriellt stora andel av dessa som besitter maximalt fyra kloratomer, framför allt klorerade etener (perkloreten/tetrakloreten, trikloreten etc.). Det innebär att t.ex. pentakloreten (PCA, användes förr som råvara för framställning av bekämpningsmedel etc.) och hexakloreten (HCA, fast förening, råvara vid framställning av kemiska produkter etc.) inte tas upp i rapporten.

Vidare har innehållet i publikationen avgränsats till att främst gälla mikrobiell nedbrytning med biostimulering i kombination med bioaugmentation. Publikationens avgränsning innebär att fytobaserad nedbrytning, dvs. nedbrytning med växter, inte tas upp. Kemisk, icke-biologisk, nedbrytning beskrivs endast översiktligt.

Information om biostimulering som ensam metod för sanering *in situ* av klorerade etener har tidigare getts i Larsson *et al.* (2014). I denna publikation, inklusive i dess Bilaga, ges nu en uppdatering av olika sätt att undersöka och utvärdera biostimulering och bioaugmentation.

Det krävs omfattande undersökningar för att bedöma om ett område förorenat av klorerade lösningsmedel kan saneras genom mikrobiell nedbrytning. Vad som kan ingå i en sådan undersökning finns beskrivet i Larsson (2009). Denna publikation ger kompletterande information kring detta.

Denna publikation är inriktad på att ge ny mikrobiell och kemisk information, betydelsefull att känna till vid användandet av förstärkt självrening för klorerade lösningsmedel. I publikationen beskrivs inte klorerade lösningsmedels egenskaper och hur de sprider sig i olika jordlager (med varierande partikelstorlekar, naturligt organiskt innehåll och hydrauliska konduktiviteter) och i berg. Rapporten redovisar inte heller tillgängliga tekniska metoder som kan användas för att undersöka och karakterisera förorenade områden som innehåller klorerade lösningsmedel, lämpligt materialval för bl.a. provtagare, grundvattenrör etc., samt vad man praktiskt bör tänka på inför provtagning och upphandling av undersökning och efterbehandling. För sådan information hänvisas till bl.a. SGF (2012), Larsson (2009), Englov *et al.* (2007), Åtgärdsportalen (2015), FRTR (2015) och US EPA (2015b).

Vid val av åtgärd för en förorenad akvifär behöver hänsyn tas till eventuell källa/hotspot. Mikroorganismer kan inte direkt bryta ned fri fas av klorerade lösningsmedel, men de kan bryta ned förorening i vatten som har halter vid eller nära föroreningens maximala effektiva löslighet. Om åtgärder som baseras på mikrobiella metoder ska ge tillräcklig effekt inom rimlig tid nedströms hotspot så behöver hotspot först åtgärdas med andra metoder än biologiska. Vad som avses med hotspot behöver förtydligas. Ibland anges hotspot motsvara område där halterna är mycket högre än i plymen nedströms hotspot men inte nödvändigtvis att det i sådan hotspot måste finnas signifikant volym av fri produkt, s.k. pool. Dessa höga halter kan istället orsakas av små volymer fri produkt inne i s.k. ganglia (små spricksystem).

I denna publikation benämns hotspot som ett område i vilket det finns en betydande mängd av fri produktfas (pool). Om denna pool har direkt kontakt med akvifären kan den under lång tid generera en avsevärd vattenvolym som innehåller halt av förorening vid dess mättnadsgrad. Mängden förorening är då så stor att sanering av denna pool med mikrobiella metoder (biostimulering och bioaugmentation) kommer att ta betydligt längre tid än vad som kan anses rimligt. Andra åtgärdsmetoder för poolen behöver då övervägas och utföras innan, eller eventuellt parallellt med, den biologiska behandlingen av plymen. Fri fas i form av residual/ganglia i begränsad del av akvifären bedöms dock kunna åtgärdas med bioaugmentation och/eller biostimulering.

3. Några övergripande förutsättningar

För att kunna genomföra förstärkt mikrobiell nedbrytning i ett område som förorenats av klorerade lösningsmedel krävs underlag och beslut i flera steg:

1. Grundläggande karakterisering av området för att bedöma potentialen för reduktiv deklorering.
2. Pilottest på plats. Alternativt kan test utföras i laboratorieskala med jord från platsen eller med speciella testprober som placeras i grundvattenrör i den förorenade akvifären (se Larsson *et al.*, 2014).
3. Sanering i fullskala. Beslut om att utföra fullskalesanering baseras då på utfallet av pilotförsöket och/eller ett eller flera laborietester.

I de följande avsnitten beskrivs vilka kemiska och mikrobiologiska undersökningar som bör ingå som del i pilottest och utförande i fullskala och hur resultaten från dessa kan bedömas. Det gäller dels lämpliga parametrar att undersöka, aktuella ämnen och föroreningar och mikroorganismer, dels vilka halter eller parametervärden som krävs för att optimera nedbrytningsprocessen. I slutet av denna rapport ges en kortfattad sammanfattande guide. I Bilaga 1 finns fördjupningsavsnitt.

För att förenkla beskrivningen av olika mikroorganismers släktskap så benämns i denna rapport de organismer som har samma initiala namn för ”släkte”. En speciell grupp inom detta släkte kallas för ”art” och speciell undergrupp till denna grupp för ”stam”, exemplifierat enligt följande:

Dehalococcoides kallas släkte, *Dehalococcoides ethenogenes* kallas art (som då är en speciell art bland flera arter inom detta släkte) och *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 kallas här stam (som då är en speciell stam bland flera stammar inom nämnda art). Därtill, i denna rapport anges ibland t.ex. det initiala namnet följt av sp. (t.ex. *Dehalococcoides* sp.). Med det menas här en art inom släktet *Dehalococcoides* som man framodlat men inte bestämt genetiskt till vilken art den tillhör. Om det initiala namnet följs av spp. menas här att det då gäller flera obestämda arter inom det angivna släktet.

3.1 Klorerade lösningsmedel

I Sverige har klorerade lösnings- och extraktionsmedel använts framför allt inom verkstadsindustri, kemiteknisk industri, elektronikindustri samt kemtvätter. De klorerade föreningar som dominerat har varit klorerade alifater, speciellt trikloreten (TCE) och perkloreten (PCE). Även 1,1,1-trikloreten (1,1,1-TCA) och dikloreten (DCA) har använts. Förbrukningen i Sverige av klorerade lösningsmedel kulminerade under 1970-talet då den uppgick till mer än 20 000 ton/år, varav TCE utgjorde hälften (Englöv *et al.*, 2007).

Vad gäller svenska kemtvättar så fanns det år 2002 ca 125 industrikemtvättar och 400 konsumenttvättar. Inom denna verksamhet dominerade PCE sedan 1950-talet. De flesta spill som upptäcktes fram till början av 2000-talet hade skett under efterkrigstiden fram till 1980-talet (Länsstyrelsen, 2002).

Olika PCE-produkter hade olika renheter vad gäller PCE-innehåll. PCE-produkterna kunde ibland innehålla upp till 1% orenheter, främst 1,1,1-TCA, koltetraklorid (CT), diklormetan (DCM) och/eller TCE. Inom kemtvättindustrin användes även 1,1,1-TCA. Användningsområdet var framför allt kemtvättning av läder (DCC, 2009).

Det var alltså framför allt PCE och TCE som användes industriellt i Sverige under 1900-talet. Både PCE och TCE samt dess nedbrytningsprodukter är mycket hälsovådliga och klassas bl.a. som cancerogena eller misstänkt cancerogena. De är dessutom miljöfarliga och kan t.ex. orsaka skadliga långtidseffekter i vattenmiljön (Länsstyrelsen, 2004). Fokus i denna publikation har därför lagts på mikrobiell nedbrytning av klorerade etener.

3.2 Mikrobiell nedbrytning

De reaktionssätt som mikroorganismer använder för att bryta ned föroreningar är antingen baserade på reduktion eller oxidation av förorening. Dessa reaktionssätt beskrivs ingående i Kapitel 4 samt i Bilaga 1. Vid mikrobiell reduktion av klorerade alifater (även kallat mikrobiell reduktiv deklorering) byts ett klor på molekylen stegvist ut mot ett väte. Förenklat så agerar den klorerade alifaten då som elektronacceptor, i konkurrens med andra geokemiska elektronacceptorer (nitrat, Fe^{3+} , etc.). Väte är då elektrondonator. Oxidation av klorerade alifater innebär istället att den klorerade alifaten är elektrondonator med koldioxid, vatten och klorid som slutliga produkter.

Möjligheterna att mikrobiellt bryta ned en förorening via reduktion eller oxidation beror bl.a. på vilken förorening det gäller, på vilket sätt nedbrytningen ska ske och vilka mikroorganismer som ska utföra nedbrytningen. Vissa klorerade alifater, t.ex. PCE, kan endast brytas ned genom reduktiva reaktioner av reducerande mikroorganismer medan andra klorerade alifater, t.ex. vinylklorid (VC) och dikloreten (DCE), kan brytas ned både oxidativt av oxiderande mikroorganismer och reduktivt av reducerande mikroorganismer. De olika organismerna kräver bl.a. olika redoxmiljöer för att utföra de olika reaktionssätten.

Eftersom alla klorerade alifater kan reduceras mikrobiellt, medan färre kan oxideras mikrobiellt, är reduktiv deklorering den förhärskande typen av mikrobiell nedbrytning vid sanering av dessa föroreningar.

3.3 Geokemiska förhållanden

Redox spelar en viktig roll för vilka möjligheter olika mikroorganismer har att bryta ned klorerade alifater. Redox i en akvifärs grundvatten styrs av dess geokemiska förhållanden, t.ex. dess syrehalt. Beroende på hur syrehalten varierar så betecknas förhållandena som oxiska eller anoxiska. Ibland används istället begreppen aerobt och anaerobt. De två första benämningarna är främst kopplade till syrehalten i vattnet/redox, medan aerobt och anaerobt främst är kopplade till biologiska processer. Strikt kemiskt anses haltgräns oxiskt/anoxiskt gå vid 0,01 mg O_2/l (Bradley, 2012b) Vanliga fältmetoder kan normalt inte mäta så låga halter av löst syre i vatten (Chapelle *et al.*, 2009). USGS (2015c) har därför föreslagit följande haltgränser:

- Oxiska vatten: Halten syre $\geq 0,5$ mg/l
- Anoxiska vatten: Halten syre $< 0,5$ mg/l.

För att få en bättre noggrannhet i bedömningen av oxiska/anoxiska förhållanden så bör man ta hjälp av kompletterande analyser av geokemiska elektronacceptorer. Dessa redovisas under rubriken ”Vattenkemi kriterium” i Tabell 3.1. USGS (2015c) anger vidare vad som innefattas i begreppen aeroba och anaeroba förhållanden:

- Aeroba förhållanden: Biologiska aktiviteter kan fortgå under förhållanden som har tillräckligt höga syrehalter för att syremolekylen kan verka som slutlig elektronacceptor vid respiratoriska/metabola processer.
- Anaeroba förhållanden: Biologiska aktiviteter kan fortgå utan tillgång till syre. Anaeroba organismer använder då annat än syre som slutlig elektronacceptor.

Det finns inte heller någon exakt gräns mellan aeroba och anaeroba förhållanden, utan underliggande kemiska kriterier varierar, se Tabell 3.1. Variationen beror på att oxiska och anoxiska processer kan ske antingen rent kemiskt eller kopplas till mikrobiella aktiviteter, i det senare fallet till olika aeroba eller anaeroba bakterier. Detta gör att man inte rakt av kan likställa oxiskt och anoxiskt med aeroba och anaeroba förhållanden.

I Tabell 3.1 ges även olika termer för olika redoxförhållanden samt normala tröskelvärden för halter av ämnen som definierar dominerande redoxprocesser i vatten.

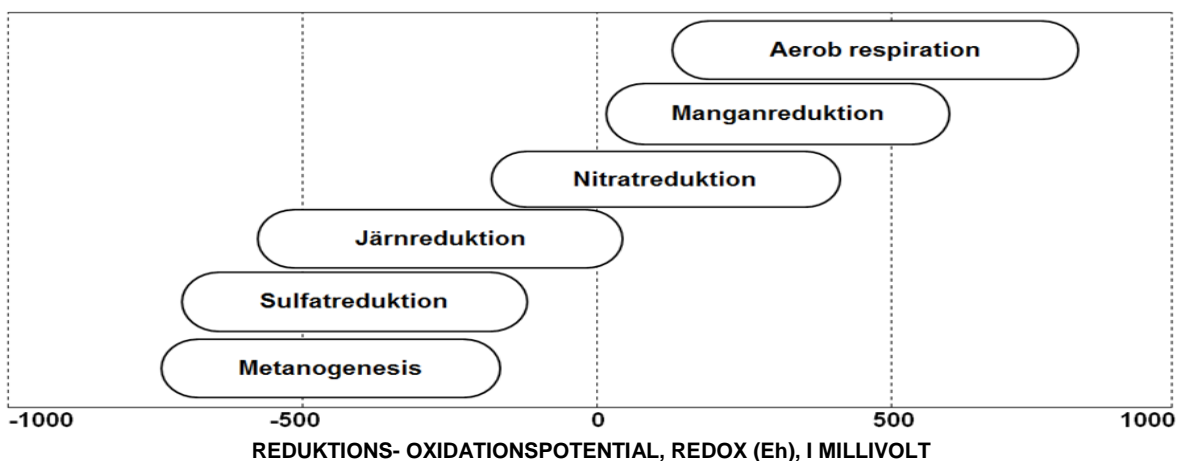
I samtliga redoxprocesser som presenteras i Tabell 3.1 så spelar elektronöverföring huvudrollen. Vid oxidativ nedbrytning av organiskt material fungerar detta material som elektrondonator, dvs. materialet ger ifrån sig elektron. Elektronen frigörs när bindning i den organiska molekylen bryts. Mycket förenklat så nyttjas denna ”donerade” elektron energimässigt av bakterien varefter elektronen måste ut ur processen. Bakterien lämnar den i en tillgänglig elektronacceptor (syre, sulfat etc.) varvid denna elektronacceptor reduceras (i fallet sulfat reduceras det till sulfid). Vid reaktiv deklorering är förhållandena de omvända, dvs. klorerade alifater fungerar som elektronacceptorer och främst väte är elektrondonator. Det innebär att de klorerade alifaterna konkurrerar om elektronerna med andra elektronacceptorer. Ju lägre redox desto färre av dessa elektronacceptorer finns. Ju mindre klorerad som den klorerade alifaten är desto mindre konkurrens om vätet kräver den för att kunna bli deklorerad, dvs. ju lägre måste redox vara. Olika redoxintervall motsvarar alltså olika mikrobiella huvudprocesser med dessa acceptorer, Figur 3.1 och Tabell 3.2.

Tabell 3.1 Beskrivning av olika termer som används för att beskriva redoxförhållanden. Även normala tröskelvärden för halter av ämnen (elektron-acceptorer och -donatorer) som definierar dominerande redoxprocesser i vatten (data från Chapelle *et al.*, 2009 och Bradley *et al.*, 2012). Röd streckade linjer indikerar precisa gränser mellan olika kategorier.

Redox	Redox-kategori	Dominerande redoxprocess	Underdisciplin		Vattenkemi kriterium (mg/l)					
			Geokem	Mikrobiol	O ₂	NO ₃ ⁻	Mn ²⁺	Fe ²⁺	SO ₄ ²⁻	Fe ²⁺ /H ₂ S
Starkt oxiderande ↑ ↓ Starkt reducerande	Oxiskt	O ₂ reduktion	Oxiskt	Aerobt (strikt oxiderande)	≥0,5	-	<0,05	<0,1	-	-
		NO ₃ ⁻ reduktion	Post-oxiskt	Anaerobt (delvis oxiderande, delvis reducerande)	<0,5	≥0,5	<0,05	<0,1	-	-
	Mn ⁴⁺ reduktion	<0,5		<0,5	≥0,05	<0,1	-	-		
	Fe ³⁺ reduktion	<0,5		<0,5	-	≥0,1	≥0,5	>10		
	Mix: Fe ³⁺ / SO ₄ ²⁻ reduktion	<0,5		<0,5	-	≥0,1	≥0,5	≥3 ≤10		
	SO ₄ ²⁻ reduktion	Anoxiskt	Anaerobt strikt reducerande	<0,5	<0,5	-	≥0,1	≥0,5	<3	
	Metanogenesis		<0,5	<0,5	-	≥0,1	<0,5	-		
	Praktiskt anoxiskt 1/	Strikt anoxiskt 2/								

1/ En del fältmetoders detektionsgränser kan ibland ligga strax över 0,5 mg O₂/l varvid halter under deras detektionsgränser i så fall får grovt tolkas som "praktiskt anoxiskt".

2/ 0,01 mg O₂/l är anoxiskt enligt Bradley (2012b) men enligt Chapelle *et al.* (2009) kan vanliga metoder inte mäta lägre än 0,5 mg O₂/l.



Figur 3.1 Intervall för reduktions- oxidationspotential för vanliga mikrobiella processer (underliggande värden från USGS, 2000).

Tabell 3.2 Slutliga elektronacceptorer, biprodukter från dessa samt motsvarande elektrondonatorer involverade i olika mikrobiella processer kopplade till klorerade lösningsmedel. Underliggande data delvis från USGS (2000).

Mikrobiell slutlig elektronacceptor	Biprodukt 1/	Mikrobiell elektrondonator	Mikrobiell process	Respirationsprocess 2/
Syre (O ₂)	H ₂ O; CO ₂	Organiska föreningar, inklusive bl.a. vissa klorerade alifater, t.ex. DCE och VC 3/	Aerob respiration	O ₂ → H ₂ O
Nitrat (NO ₃ ⁻)	Ammoniak (NH ₃)		Nitratreduktion	NO ₃ ⁻ → N ₂
Mangan (Mn ⁴⁺)	Mangan (Mn ²⁺)		Manganreduktion	MnO _{2(s)} → Mn ²⁺
Järn (Fe ³⁺)	Järn (Fe ²⁺)		Järnreduktion	FeOOH _(s) → Fe ²⁺
Sulfat (SO ₄ ²⁻)	Sulfid (S ²⁻)		Sulfatreduktion	SO ₄ ²⁻ → HS ⁻
Koldioxid (CO ₂)	Metan (CH ₄)		Metanogenesis	CO ₂ → CH ₄
Klor -etener, -etaner, -metaner	Molekyl med ett klor mindre än ursprungsmolekylen	Väte	Reduktiv deklorering	H ₂ + C _x H _y Cl _z → C _x H _{y+1} Cl _{z-1} + HCl

1/ Bildad ammoniak är en biprodukt (ett av flera steg i nitratreduktionsprocessen) och N₂ är slutprodukten.

2/ S²⁻ står i jämvikt med HS⁻ i vatten och jämvikten är pH-beroende.

3/ Gäller inte för PCE och gäller för TCE endast i undantagsfall och då cometaboliskt, se Kapitel 4 om oxidativ nedbrytning.

Principiellt gäller alltså att ju mindre andel klor som en klorerad alifat besitter desto ”svårare” är det att deklorera den vilket gör att högre halt väte krävs och därmed lägre redox. Förenklat så kan exempelvis PCE dekloreras reduktivt till TCE under nästan alla redoxförhållanden (inte under syrerika och i viss mån inte heller under nitratreducerande förhållanden). TCE kan genomgå deklorering till DCE (mikrobiellt främst till *cis*-DCE) under redoxförhållanden motsvarande järnreduktion eller lägre. VC kan endast dekloreras reduktivt under förhållanden som motsvarar metanogenesis samt i viss mån i den undre delen av det redoxintervall som motsvarar sulfatreduktion.

Som anges i Tabell 3.2 krävs vanligtvis väte för att reduktiv deklorering av klorerade etener ska kunna genomföras. Detta väte kan fås t.ex. genom att organiskt material fermenteras. Denna fermentation utförs vanligtvis av helt andra mikroorganismer än de som kan utföra dekloreringen. Fermentation beskrivs i Bilaga 1.

4. Nedbrytning av klorerade lösningsmedel

4.1 Inledning

Att förstå de mekanismer som är involverade är en förutsättning för en lyckad sanering som bygger på nedbrytning av klorerade alifater. Om inledande laboratorie- och/eller fälttester visar att nedbrytning är en lämplig saneringsmetod så bör ett av de första designbesluten inför fullskalesanering vara att bestämma om nedbrytningen ska utföras biotiskt (biologiskt) och/eller abiotiskt (kemiskt).

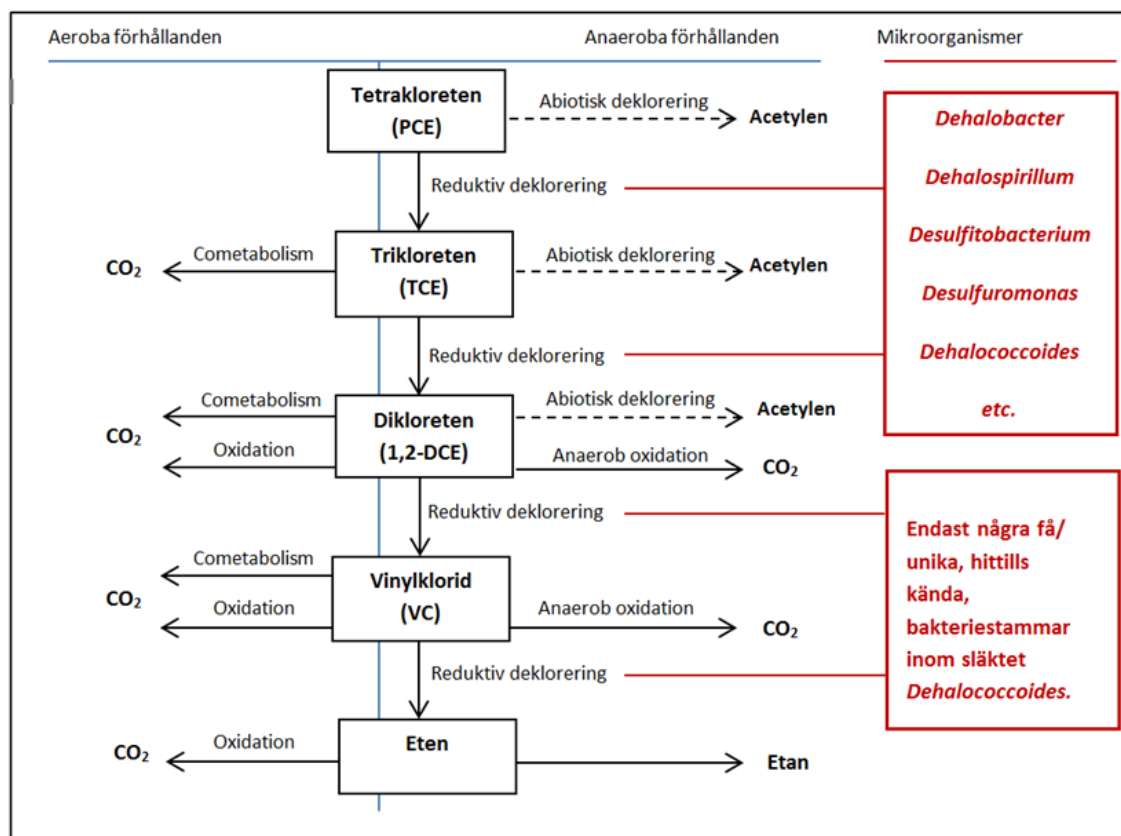
Man behöver också besluta om nedbrytningen ska ske genom reduktiv deklorering eller oxidativ nedbrytning och om den ska ske metaboliskt eller cometaboliskt. Detta är kopplat till bl.a. vilka klorerade föreningar som ska brytas ned, vilka reaktionssätt som detta kan ske med och vilka mikrobiella och kemiska förutsättningar som krävs för reaktionerna. Vilka mellan- och slutprodukter i nedbrytningskedjan som kan accepteras har också betydelse för hur man väljer att designa sin efterbehandlingsåtgärd.

Biotiska (biologiska) angreppssätt, där mikroorganismer spelar huvudrollen, kräver kunskap om bl.a. vilka bakterier som kan göra vad och vad de behöver för att nedbrytningsprocessen ska fungera optimalt. Därtill krävs kunskap om vilken roll som de platsspecifika föreningarna spelar kemiskt och biologiskt (elektronacceptorer, -donatorer, hämmare/toxicitet etc.), och hur länge de olika processerna kan förväntas pågå.

De nedbrytningsätt som hittills har övervägts i Sverige inför fullskalesaneringar av klorerade alifater inkluderar bl.a. mikrobiell reduktiv deklorering, antingen som enskild metod eller i samspel med abiotisk (icke-biologisk) nedbrytning. På senare tid har alternativ mikrobiell oxidativ nedbrytning rönt ökat intresse för vissa lågklorerade alifater. Bakomliggande kemi och mikrobiologi beskrivs mer ingående i Bilaga 1 (se även Avsnitt 4.5.1). Det finns indikationer på att kombinationen med reduktiv deklorering av högklorerade kolväten (TCE, PCE) och oxidativ deklorering VC (och i viss mån av DCE) blivit ett allt vanligare sätt att projektera en *in situ*-sanering (reduktion av högklorerade kolväten i det reducerade källområdet och sedan oxidation av VC, och ev. DCE, i plymens ytterområde). Eventuellt kan miljön i ytterområdet förstärkas med tillsats av syre genom t.ex. air sparging eller injektering av syreavgivande medel.

I Figur 4.1 ges de vanligaste abiotiska och biotiska reaktionssätten för klorerade etener. I figuren redovisas också några exempel på idag kända mikroorganismer som kan utföra de biotiska reaktionerna. I de följande avsnitten ges fördjupad information om dessa reaktionssätt.

Haltreduktion av en förorening i grundvatten kan, förutom biotisk och abiotisk nedbrytning, även ske genom andra processer. I dessa ingår bl.a. fastläggning, utspädning och gasavgång. Alla processer som på naturligt sätt (d.v.s. opåverkat av människan) minskar halterna ingår i begreppet naturlig självrening. Naturlig mikrobiell reduktiv deklorering är alltså bara en del av den naturliga självreningen. Förstärkt naturlig självrening (t.ex. förstärkt biologisk/mikrobiell självrening) innefattar åtgärder med vilka människan påverkar/förbättrar den naturliga biologiska/mikrobiella självreningen. Detta kan ske t.ex. genom att tillsätta ämnen som stimulerar naturligt befintliga föroreningsnedbrytande bakterier i marken, så kallad biostimulering eller genom att tillsätta bakterier/mikroorganismer som påskyndar nedbrytningen, så kallad bioaugmentation. Fördjupad information ges i Bilaga 1.



Figur 4.1 Schematisk beskrivning av olika nedbrytningssätt av klorerade etener samt exempel på mikroorganismer som utför reduktiv deklorering av klorerade etener. Modifierat och kompletterat schema, baserat delvis på information från AFCEE (2007) och delvis från Hammer (2011).

4.2 Mikrobiell nedbrytning

En del klorerade alifater kan enbart brytas ned reduktivt, andra främst oxidativt. Vissa kan brytas ned både reduktivt och oxidativt med varierande effektivitet och hastighet beroende på de kemiska och mikrobiella förhållandena. En av flera viktiga faktorer som styr nedbrytningshastigheten är om reaktionerna sker metaboliskt eller cometaboliskt.

Mikrobiell nedbrytning utförs av enzym i mikroorganismerna. Dessa enzym kan antingen dra nytta av nedbrytningsreaktionerna genom att de ser till att samtidigt utvinna energi och näring för celluppbyggnad. Detta kallas metabola reaktioner. Alternativt kan nedbrytningen ske utan någon nytta för cellen, s.k. cometabola reaktioner. För att deklorering ska kunna ske cometaboliskt krävs att andra reaktioner sker i enzymen med andra ämnen som genererar energi/celluppbyggnad. Dekloreringen sker då passivt, ”av bara farten”, parallellt med den reaktion som ger energi. Denna cometabola omvandling är mindre vanlig än motsvarande metabola omvandling, dvs. antal molekyler som omvandlas/tidsenhet är mycket färre än vid metabol dito. För deklorering av klorerade lösningsmedel är alltså metabola reaktioner att föredra, men det kräver bl.a. att motsvarande specialiserade mikroorganismer föreligger med aktiva gener som producerar de metabola enzymen.

Bakterier som klarar av att metaboliskt reduktivt deklorera högklorerade alifater är relativt vanligt förekommande i anaeroba miljöer. Bakterier som klarar av att metaboliskt reduktivt deklorera lågklorerade etener (främst vinylklorid till eten) är däremot sällsynta. Till dags dato finns endast ett känt bakteriesläkte, *Dehalococcoides* (*Dhc*), av vilket det bara finns en känd art (*Dehalococcoides*

ethenogenes), varav endast några få stammar (t.ex. *Dehalococcoides ethenogenes* strain VS) inom denna art har metabola enzym som kan deklorera VC (Li, 2012; Shani, 2012). En förutsättning för sanering med hjälp av förstärkt mikrobiell självrening ska fungera tillfredsställande är att dessa mikroorganismer finns närvarande och att nedbrytningshastigheten är tillräckligt hög. I följande avsnitt och i Kapitel 5 samt i Bilaga 1 beskrivs detta mer ingående.

För att mikrobiell nedbrytning av klorerade alifater ska ske med god hastighet krävs bl.a. mikroorganismer med enzym som utför reaktionerna metaboliskt och att dessa mikroorganismer inte motverkas av toxiska ämnen och/eller andra mikroorganismer. Därför är det betydelsefullt att känna till om de mikroorganismer som man avser att nyttja för nedbrytningen besitter de enzym som ska utföra reaktionerna. Det är också viktigt att veta om dessa enzym utför reaktionerna metaboliskt eller cometaboliskt.

Även icke-biologiska faktorer har betydelse för optimal nedbrytning. Vid åtgärdsutredningar som rör *in situ* metoder i allmänhet bedöms bl.a. geologi, hydrogeologi och förorenings tillgänglighet som viktiga förutsättningar för val av metod. För mikrobiell förstärkt självrening har dessa förutsättningar i princip samma inverkan som för andra aktiva saneringsmetoder, t.ex. tillgänglighet av förorening (i det här fallet för mikrobiell nedbrytning). Sådana faktorer tas inte upp i denna publikation utan hänvisas istället till referenser givna i Kapitel 2.

Enzym är vanligtvis kortlivade och de är delvis härav svåra/dyra att analysera. Produktionen av enzymen styrs av ”påslagna” gener i mikroorganismen. Förekomst och koncentration av dessa gener är mycket lättare att analysera än att analysera själva enzymen. Om man känner till vilka gensekvenser som kodar för produktion av de aktuella enzymen så kan motsvarande funktionella gener analyseras i organismernas DNA, eller än bättre i RNA (gener i RNA indikerar aktiv produktion av enzymerna medan motsvarande gener i DNA endast indikerar potential för produktion). Sådana analyser (qPCR; quantitative polymerase chain reaction) utförs av kommersiella laboratorier för en rimlig kostnad och börjar bli standard vid undersökningar kopplade till mikrobiell nedbrytning av framför allt klorerade etener. Med sådan teknik kan man i t.ex. ett grundvattenprov kvantifiera speciella mikroorganismer och gener som kopplas till produktion av metabola enzym som bryter ned t.ex. klorerade etener. Enkel beskrivning av qPCR ges i ITRC (2011).

4.3 Redoxförhållanden

Principiellt kan olika klorerade molekyler brytas ned mikrobiellt med något/några/alla av följande fyra sätt: reduktivt metaboliskt, reduktivt cometaboliskt, oxidativt metaboliskt och oxidativt cometaboliskt.

I princip gäller att ju mindre andel klor som den klorerade alifatmolekylen besitter, desto starkare anaeroba förhållanden, dvs. desto lägre redox, krävs för att mikrobiell reduktiv deklorering av molekylen ska kunna utföras. Om däremot molekylen ska oxideras mikrobiellt krävs i princip motsatta redoxförhållanden.

Analys av redoxparametrar (O_2 , NO_3^- , Fe^{2+} , Mn^{2+} , SO_4^{2-} och metan) kan ge stöd vid tolkning av redox. Redoxförhållanden som ger potential för antingen reduktiv eller oxidativ nedbrytning av klorerade etener exemplifieras i Tabell 4.1. Observera, redoxvärdena är givna som ORP med standard väteelektrod (SHE). Värden med fältelektroder ska för jämförelse räknas om till SHE, beroende på elektrod, temperatur etc., se tabeller i US EPA (2013b), vanWalt (2012), Wiki (2015).

VC bildas i ett av de sista stegen i klorerade eteners deklorerings-/nedbrytningskedja (Avsnitt 4.3.1). Det innebär att VC vanligtvis föreligger i högsta koncentrationer i nedre horisontella delen

av en kloretenplym. I denna del av plymen kan redoxförhållandena ibland inte vara tillräckligt låga för optimal vätehalt för reduktiv deklorering till eten (Figur 4.1). Det är då viktigt att känna till att VC alternativt kan oxideras vid relativt låga redox. Information om olika nedbrytningsprocesser visavi redox och andra faktorer ges i efterföljande kapitel samt i Bilaga 1.

Tabell 4.1 Relativ förmåga att mikrobiellt bryta ned (metaboliskt såväl som cometaboliskt) för olika klorerade etener under olika redoxförhållanden (info delvis från Bradley, 2003). Optimal redox potential (mV) med väte-elektrod (SHE), från US EPA (2013). MRD = mikrobiell reduktiv deklorering, MO = mikrobiell oxidation.

Förening	Biotisk mekanism	Redoxförhållande						
		Aerobt \ nitratreduktion	Mangan-reduktion	Järn-reduktion	Sulfat-reduktion	Metano-genesis	Aceto-genesis	H ⁺ /H ₂
		810 \ 750 mV	580 mV	-80 mV	-210 mV	-240 mV	-400 mV	-410 mV
PCE	MRD	– \ Måttlig 4/	Bra	Bra	Utmärkt	Utmärkt	Utmärkt	Utmärkt
	MO	Måttlig 1/	–	–	–	–	–	–
TCE	MRD	– \ Måttlig 4/	Måttlig	Bra	Bra	Utmärkt	Utmärkt	Utmärkt
	MO	Måttlig–bra 1/	–	–	–	–	–	–
cis-DCE	MRD	Dålig	Dålig	Dålig	Måttlig	Bra	Utmärkt	Utmärkt
	MO	Bra(–utmärkt) 3/	Bra	Dålig	Dålig	Dålig	Dålig	Dålig
VC	MRD	Dålig	Dålig	Dålig	Måttlig	Måttlig	Utmärkt	Utmärkt
	MO	Utmärkt	Utmärkt	Utmärkt–bra	Måttlig	Måttlig–dålig 2/	Dålig	Dålig

”–”/ Inga bevis på denna process under givet redoxförhållande.

1/ Gäller främst cometaboliskt. (Metabol oxidativ attack på PCE har hittills rapporterats kunna utföras endast av *Pseudomonas stutzeri OX1* med enzymet toluen-*o*-xylene monooxygenas (Ryoo et al., 2000). Bör härav betraktas som udda.)

2/ Dålig vid metanbildning men måttlig vid fermentation av humussyror (vid detta redox).

3/ Gäller främst cometaboliskt. (Metabol oxidativ attack på cis-DCE har hittills rapporterats endast kunna utföras av *Polaromonas sp. strain JS666* (Jennings et al., 2013). Bör härav betraktas som udda. Se vidare Bilaga 1).

4/ Enligt USGS (2015) kan PCE och TCE reduktivt dekloreras under redox motsvarande nitratreduktion. Dock anger Wrenn (2004) att nitrat har dubbelt så stark konkurrens om vätet, jämfört med PCE och något mindre skillnad för TCE. Härav bör MRD-bedömningen för PCE och TCE vs. nitrat eventuellt vara ”Dålig–måttlig”.

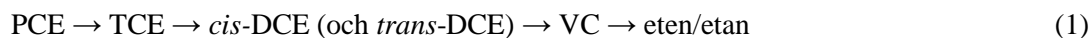
4.4 Reduktiv deklorering

Reduktiv deklorering av klorerade alifater nyttjas främst mikrobiellt (biotiskt), men kan i vissa fall även ha betydelse rent kemiskt, dvs. utan mikrobiell närvaro (abiotiskt). Förstärkt mikrobiell nedbrytning av klorerade alifater, framför allt av klorerade etener, använder sig till mycket stor del av reduktiv deklorering.

4.4.1 Med mikroorganismer (biotiskt)

Mikrobiell reduktiv deklorering är den process som idag i de flesta kontrollerade fall nyttjas för att bryta ned alla klorerade lösningsmedelsmolekyler, oavsett antal klor i molekylen. I denna process ingår nyttjande av mikroorganismer som attackerar molekylerna metaboliskt. Processerna är relativt snabba, förutsatt att vissa förhållanden föreligger.

Mikrobiell reduktiv deklorering av klorerade lösningsmedel utförs stegvis, vanligtvis genom att ett väte ersätter ett klor på molekylens, exemplifierat för klorerade etener:



Vid mikrobiell deklorering av TCE bildas vanligtvis avsevärt mer av isomeren *cis*-DCE än av isomeren *trans*-DCE. Om det föreligger ungefär lika mycket av *trans*-DCE som *cis*-DCE så brukar man anse att detta bildats genom någon form av kemisk nedbrytning. Det finns även en tredje isomer av DCE, benämnd 1,1-DCE. Den bildas främst via icke-mikrobiell (abiotisk) transformering av någon av två isomerer av trikloretan (TCA), samt i vissa fall mikrobiellt (biotiskt) via transformering av en isomer av tetrakloretan (TeCA). Mikrobiell bildning av 1,1-DCE från TCE anses inte ske i någon nämnvärd utsträckning (US DOE, 2006; Bradley, 2003).

Det finns dock undantag vad gäller mikrobiellt bildande av *trans*-DCE och 1,1-DCE. Griffin *et al.* (2004) fann att en okänd art och stam inom släktet *Dehalococcoides* som producerade avsevärt mer (ca 3 ggr mer) av *trans*-DCE än *cis*-DCE, men endast vid närvaro av ampicillin (ett semisyntetiskt antibiotikum). Någon mikrobiell deklorering av *trans*-DCE till VC visade sig dock inte ske. I frånvaro av ampicillin bildades mer av *cis*-DCE än *trans*-DCE. Detta tolkades så att de bakterier som bildade *trans*-DCE var, i motsats till de bakterier som bildade mer *cis*-DCE än *trans*-DCE, okänsliga för ampicillin och liknande antibiotikum. Sex år senare visade Cheng *et al.* (2010) att ovan okända art och stam var *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 med förmåga att bilda *trans*-DCE.

Kommersiella kloretenprodukter kan ibland innehålla DCE (vanligtvis då i små, men detekterbara andelar). Därtill är det mer vanligt att *trans*-DCE kan bildas kemiskt/abiotiskt, jämfört med *cis*-DCE. Ovan visar att om det i en akvifär finns ungefär lika stor eller större andel av *trans*-DCE, jämfört med *cis*-DCE, så är det inte något säkert bevis på t.ex. att den ursprungliga spillda kloretenprodukten innehöll *trans*-DCE. Om man därtill över tid finner att halterna av DCE totalt ökar, samt att förhållandet *trans*-DCE/*cis*-DCE ökar, så är det inget bevis på att bildandet skett kemiskt (det kan alltså istället vara mikrobiellt producerat). Dock, om man finner att halterna av DCE totalt ökar samtidigt som förhållandet *cis*-DCE/*trans*-DCE ökar så är detta med stor sannolikhet orsakat av mikrobiell deklorering av TCE.

I vissa fall kan *trans*-DCE bildas mikrobiellt av andra mikroorganismer än av *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. Manchester *et al.* (2012) fann att bakterier i släktet *Dehalobacter* kan deklorera 1,1,2,2-TeCA till *trans*-DCE samt att vid fullständig deklorering av 1,1,2,2-TeCA till eten så är bakterier från både *Dehalogenimonas*- och *Dehalococcoides*-släktena involverade.

Vad gäller mikrobiellt bildande av 1,1-DCE från TCE så anses det ske ytterst sällan. Emellertid fann Zhang *et al.* (2006), i prov från en deponi, mikroorganismer inom släktet *Dehalococcoides* med förmågan att fullständigt deklorera TCE via främst 1,1-DCE (förhållandet 1,1-DCE/*cis*-DCE var 2,4). Även denna udda mikrobiella deklorering skedde i närvaro av ampicillin. Men i frånvaro av detta antibiotikum skedde istället den normala mikrobiella produktionen av *cis*-DCE (från TCE).

I den ovan givna reaktionsvägen (1) anges eten/etan som produkt från deklorering av VC. Egentligen är det endast eten som bildas på så sätt. Etan bildas genom reduktion av eten. Det sker under anaeroba förhållanden av andra organismer än deklorerare (deBruin *et al.*, 1992; Koene-Cottaar och Schraa, 1998).

Närvaro av etan under anaeroba förhållanden, kopplat till mikrobiell reduktiv deklorering av VC, ger information om att eten dessförinnan bildats. Om låga halter eten och höga halter etan föreligger och om endast eten analyseras kopplat till deklorering av VC så kan det ge missvisande bild av vad som skett. Därför analyseras normalt både eten och etan. Summan av etan och eten ger en

bättre avspegling av mikrobiell reduktiv deklorering av VC. Emellertid, frånvaro av eten och etan är inget bevis på att deklorering av VC inte skett eftersom båda kan oxideras. Tolkningen av eten och etan kompliceras av att de är flyktiga och kan bildas även genom andra reaktioner. Om man, vid t.ex. frånvaro av eten/etan, vill fastställa med hög säkerhet att VC brutits ned så är isotopanalyser lämpliga (beskrivs i Avsnitt 5.1.4).

Högklorerade etener (PCE, TCE) kan dekloreras reduktivt av ett stort antal olika mikrobiella släkter och bilda lågklorerade etener (DCE, VC). Men dessa lågklorerade etener kan endast dekloreras till icke-klorerade föreningar av vissa stammar inom släktet *Dehalococcoides* (*Dhc*). Hittills har endast stammar inom arten *Dehalococcoides ethenogenes* befunnits klara detta. Det anses numera till och med vara så att dessa stammar endast kan använda halogenerade kolväten (t.ex. klorerade dito) som slutliga elektronacceptorer (Hug *et al.*, 2013b). Det innebär t.ex. att när halten av de lågklorerade etenerna minskar så minskar även halten av dessa stammar av *Dhc*.

Detta indikerar att dessa speciella stammar av *Dhc* föreligger i ytterst låga koncentrationer, eller rent av inte existerar, i områden som saknar organiska halogenföreningar. Det innebär i sin tur att om de inte ursprungligen fanns i ett område som förorenas av klorerade lösningsmedel så kommer de heller inte att finnas därefter. Detta är sannolikt orsaken till att det finns åtskilliga områden som är förorenade av klorerade lösningsmedel, men som saknar dessa speciella stammar av *Dhc*, och därmed inte kan genomgå fullständig nedbrytning. Om bakterierna finns så är det inte ovanligt att de föreligger i alltför låga halter och/eller att de inte har önskad genetisk förmåga att deklorera VC. Beroende på vad orsaken är så kan detta åtgärdas med bioaugmentation och/eller biostimulering (förklaras i Bilaga 1).

Med koppling till detta kan här nämnas att en dansk undersökning, utförd på elva områden förorenade med klorerade etener, visade att det fanns *Dhc* (släktet) i flera av dessa områden men att dessa *Dhc* inte hade genetik som var nödvändig för produktion av enzymer som deklorerar VC (de speciella stammarna av *Dhc* var alltså frånvarande). Dessutom var halterna av *Dhc* alltför låga (Bjerg *et al.*, 2006).

Det räcker alltså inte med att analysera släktet *Dhc*. Man behöver även analysera om de speciella stammarna föreligger samt att de finns i tillräckligt höga halter. Detta kan fås genom speciell analys av vissa unika gener som kodar för produktion av de enzymer som kan deklorera lågklorerade etener, se vidare Avsnitt 5.2.2 samt Bilaga 1.

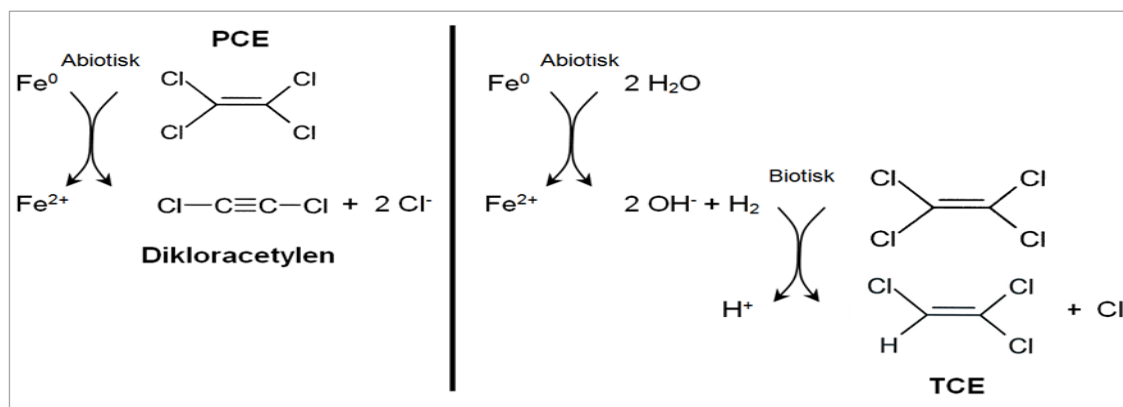
Den unika förmågan, som alltså vissa stammar av *Dhc* har, att deklorera lågklorerade etener gör deras närvaro och aktivitet ytterst viktiga. Frånvaro av dessa stammar innebär att nedbrytningen inte blir fullständig och resulterar i ökad halt och mängd av DCE och framför allt av cancerogent VC. Det räcker dock inte att endast dessa stammar föreligger med halter över vissa nivåer. Det måste därtill bl.a. finnas fermentationsbakterier som genom fermentation av befintlig eller tillsatt kolkälla producerar nödvändig elektron-donator, vanligtvis väte (fermentation förklaras i Bilaga 1).

I en akvifär förorenad av PCE och/eller TCE krävs samspel mellan vanligt förekommande mikroorganismer (t.ex. *Dehalobacter*, *Geobacter*) och alltså vissa relativt unika stammar av *Dehalococcoides ethenogenes* för fullständig deklorering till eten. I undantagsfall behöver dock de vanligt förekommande mikroorganismerna inte föreligga och det är i det speciella fall då *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 finns närvarande och är aktiv. Denna stam har den unika egenskapen att kunna deklorera både högklorerade och lågklorerade etener. Övriga stammar av *Dehalococcoides ethenogenes* kan inte deklorera PCE, en del stammar enbart DCE och VC och några stammar även TCE. Detta innebär att det vanligtvis krävs kombinationer av olika mikroorganismer för att alla klorerade etener ska kunna fullständigt dekloreras.

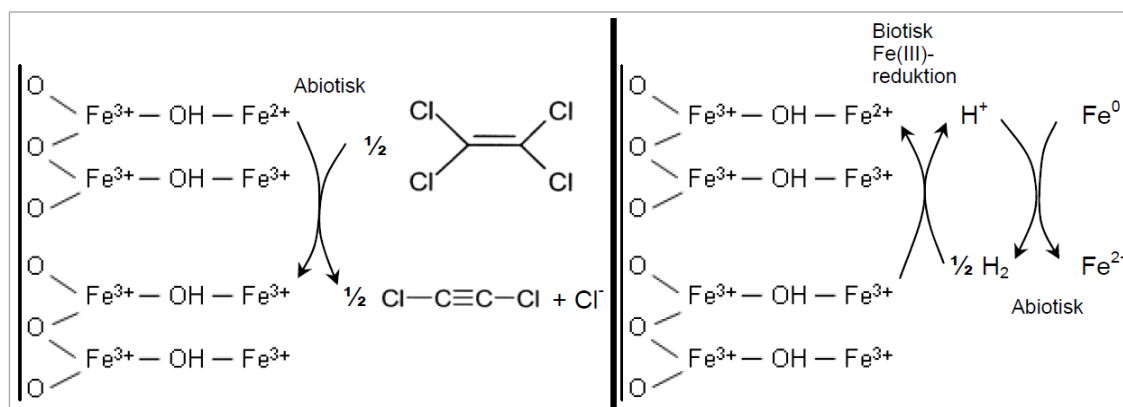
Utöver de här speciella mikroorganismerna måste det även finnas bl.a. elektrondonatorer. För deklorering av lågklorerade etener är väte den enda fungerande elektrondonatorn, eftersom *Dhc* endast kan använda väte som sådan donator. En del av de mikroorganismer som bara kan deklorera högklorerade etener kräver också väte, men det finns några av dessa mikroorganismer som endast nyttjar acetat som elektrondonator, t.ex. *Desulfuromonas* sp. strain BB1 och *Desulfuromonas chloroethenica* (McLean *et al.*, 2015).

4.4.2 Utan mikroorganismer (abiotiskt)

Deklorering av klorerade alifater kan också ske abiotiskt, dvs. reduktionen sker utan biologisk inverkan. Abiotisk reduktion sker vanligtvis på ytor (av t.ex. nollvärt järn, zink, järnsulfider, etc., Tobiszewski och Namieśnik 2012; Wrenn 2004; ESTCP, 2008; Jeong och Hayes, 2007; AFCEE, 2007), som har tillräckliga "krafter" att tänja och stödja en uppbyggnad av bindningar i molekylerna. I Figur 4.2 ges exempel på abiotisk reductiv deklorering med nollvärt järn. I Figur 4.3 ges exempel på motsvarande på en yta bestående av tvåvärt järn.



Figur 4.2 Vänster: Abiotisk reductiv deklorering med nollvärt järn. Höger: Korrosion i vatten av nollvärt järn varvid väte produceras abiotiskt som i sin tur supporterar biologisk reductiv deklorering (från Larsson, 2009).



Figur 4.3 Vänster: Abiotisk reductiv deklorering med Fe(II). Höger: Biologisk regenerering av Fe(II), kopplat till abiotisk produktion av väte med nollvärt järn (från Larsson, 2009).

Tillsats av nollvärt järn för reductiv deklorering är en beprövad teknik och beskrivningar ges i bl.a. ESTCP (2010) och i Quinn *et al.* (2005). Ju mindre partiklarna är desto större reaktiv yta per volym- eller viktenhet. Det innebär att användandet av nanopartiklar kan vara mer effektivt än av

mikropartiklar. Det bör dock noteras att man i vissa fall frångått användandet av nanopartiklar, bland annat på grund av osäkerheter i huruvida de kan vara skadliga för människan. Därtill, när det nollvärda järnet är fullt ut oxiderat har det tappat sin aktivitet. Någon sammanställning av hur länge järnet är aktivt i klorerade akvifärer har inte gått att finna i litteraturen. Man bör också beakta att tillsatta järnpartiklar kan vara svåra distribuera effektivt i en akvifär.

De reaktionsprodukter som bildas vid kemisk deklorering av klorerade etener med nollvärt järn är främst kloracetylen, acetylen och olika kloreter för vidare transformering till etan och eten. Nollvärd zink har visat sig kunna deklorera PCE och TCE, i det förra fallet till dikloracetylen och kloracetylen medan i det senare fallet till enbart kloracetylen. Dikloracetylen omvandlas snabbt till *trans*-DCE och kloracetylen och kloracetylen i sin tur till acetylen eller VC. Även järnsulfid (FeS) kan effektivt deklorera klorerade etener som PCE och TCE under anoxiska förhållanden till acetylen som huvudprodukt men även till *cis*-DCE, 1,1-DCE eten och etan (Tobiszewski och Namieśnik 2012; Wrenn, 2004). Det kan tilläggas att om man tillsätter vitamin B12 (cyanocobalamin) till FeS så kan, speciellt vid höga pH, denna tillsats avsevärt förbättra järnsulfidens kemiska deklorering (Kyung *et al.*, 2016).

4.4.3 Biotiskt – abiotiskt samspel

Biotiska – abiotiska samspel för reduktiv deklorering innefattar vanligtvis antingen att

1. den abiotiska delen kemiskt understödjer den biologiska (biotiska) delen eller att
2. den abiotiska delen utför fortsatt deklorering efter att den biotiska delen avstannat.

Exempel på 1/ är då nollvärt järn tillsätts till akvifären varvid väte bildas abiotiskt. Detta väte kan biotiskt användas av de bakterier som har förmågan att reduktivt deklorera klorerade alifater. Det kräver dock att redox är lågt (ju lägre redox desto mindre konkurrens för mikroorganismerna om vätet), eftersom befintliga geokemiska elektronacceptorer (syre, nitrat, manganoxider, järnoxider, sulfat etc.) konkurrerar om tillgången av vätet. Ju högre redox desto större roll spelar det tillsatta järnet istället som redoxsänkare.

I Figur 4.2, höger, och Figur 4.3, höger, ges exempel på hur biotisk deklorering kan dra nytta av abiotisk produktion av väte. Samspelet förutsätter att molekylen inte är alltför nära/på metallytan (i annat fall kan reaktionen ske enbart abiotiskt, se föregående avsnitt).

Exempel på 2/ är t.ex. de fall då enbart biostimulering (tillsats av fermenterbar kolkälla) inte ger fullständig deklorering. Exempelvis, i en PCE-TCE förorenad akvifär tillsattes laktat varvid dess fermentation bildade väte som i sin tur möjliggjorde för befintliga bakterier att deklorera föreningarna till *cis*-DCE. Emellertid fanns inga *Dehalococcoides* spp. med förmåga att deklorera *cis*-DCE (och vidare bilda VC och slutligen eten) varvid dekloreringen avstannade vid *cis*-DCE. Nollvärt järn tillsattes som resulterade i att en del av kvarvarande högklorerade etener samt *cis*-DCE deklorerades abiotiskt (Lacinova *et al.*, 2012). En variant är att tillföra kolkälla och nollvärt järn samtidigt. Kommersiella produkter med denna kombination finns på marknaden (Hill *et al.*, 2004).

Tillsats av nollvärt järn för abiotisk deklorering kan ses som ett alternativ till bioaugmentation (beskrivs i Bilaga 1). Sådant abiotiskt alternativ bildar inte något VC av *cis*-DCE utan istället bildas acetylen. Dock, om utgångsföreningen är PCE så kan det abiotiskt omvandlas till dikloracetylen (Figur 4.2) som i sin tur abiotiskt omvandlas till kloracetylen och vidare till dels VC och dels acetylen. Dikloracetylen kan alternativt omvandlas till *trans*-DCE. Acetylenerna är instabila och deras naturliga omvandling är snabb (Tobiszewski och Namieśnik, 2012).

4.5 Oxidativ nedbrytning

I denna publikation har huvudfokus lagts på mikrobiella metoder för omvandling av klorerade etener. I avsnittet om reduktiv deklorering ovan visades att dessa föreningar i olika utsträckningar kan reduktivt dekloreras både med och utan mikroorganismer (biotiskt resp. abiotiskt), beroende bl.a. på redox (Tabell 4.1). Så är fallet även för oxidativ nedbrytning. Men i motsats till abiotisk reduktiv deklorering är abiotisk oxidation ett helt separat tekniskt metodområde, generellt kallat för kemisk oxidation. Generellt gäller att kemisk oxidation med starka oxidationsmedel kan bryta ned de klorerade föreningarna avsevärt snabbare än motsvarande mikrobiell oxidation.

Nedan beskrivs kortfattat först om mikrobiell (biotisk) oxidativ nedbrytning av klorerade etener som efterföljs av kortfattad beskrivning av kemisk (abiotiskt) oxidativ nedbrytning. I Bilaga 1 ges fördjupad information om mikrobiell (biotisk) oxidativ nedbrytning av klorerade etener, framför allt avseende VC och i viss mån av DCE.

4.5.1 Med mikroorganismer (biotiskt)

Internationellt (och nationellt) har sanering med mikrobiella metoder i akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel hittills främst fokuserat på reduktiv deklorering. Ofta har dekloreringen stannat av (s.k. stallning) vid *cis*-DCE och eventuellt VC, vilket resulterat i en oönskad uppkoncentrering av dessa ämnen. Orsaker kan t.ex. ha varit alltför högt redox och/eller alltför lite fermenterbar kolkälla/fermentation/produktion av väte. Den främsta orsaken brukar dock vara frånvaro av mikroorganismer som har förmågan att reduktivt deklorera *cis*-DCE och VC. Ett miljömässigt viktigt alternativ eller komplement, som under den senaste tiden fått ökad aktualitet, är mikrobiell oxidativ nedbrytning av lågklorerade alifater, framför allt av VC och i viss mån DCE, då redox är alltför högt för reduktiv deklorering av dessa (Jennings *et al.*, 2013).

Mikrobiell oxidativ nedbrytning av klorerade lösningsmedel kräver helt andra förutsättningar än mikrobiell reduktiv deklorering. Vid reduktiv deklorering agerar de klorerade etenerna som elektronacceptorer och väte är den dominerande elektron donatorn. Vid oxidativ mikrobiell nedbrytning är de klorerade kolvätena istället elektron donatorer och vanliga geokemiska ämnen/föreningar elektronacceptorer (t.ex. syre, nitrat, Fe^{3+} etc.).

I motsats till reduktiv deklorering sker inte någon stegvis omvandling till mindre klorerade alifater vid oxidativ nedbrytning. Istället oxideras molekylerna till koldioxid, vatten och klorid. Detta kan ge mikrobiell oxidativ nedbrytning stora fördelar, dels genom att av oxidation av DCE inte bildas VC, dels att oxidation av VC inte kräver så extrema förutsättningar som vid reduktiv deklorering (bl.a. mycket lågt redox, väte och speciella stammar inom bakteriesläktet *Dhc*).

Mikrobiell oxidativ nedbrytning kan ske både metaboliskt och cometaboliskt. För klorerade etener kan metabol oxidation endast ske på lågklorerade etener, främst VC men även DCE. Detta i motsats till cometabol oxidation som kan ske i signifikant omfattning på VC, DCE och TCE. Metabol oxidation av VC och *cis*-DCE kräver dock inte lika höga syrehalter som vid motsvarande cometabola oxidationer.

Relativt låga halter av VC kan föreligga i yttre delen av en plym, men halterna kan där ändå överstiga miljömässigt acceptabla halter och utgöra ett problem. Situationen kan förvärras vid förstärkt mikrobiell självrening där målsättningen är att temporärt bilda VC för vidare deklorering till eten. Om tillförseln av VC är större än vad befintliga reduktivt deklorerande bakterier hinner med att bryta ned, så kan det teoretiskt uppkomma halter av VC vid yttre delen av plymen som är oacceptabelt höga. I denna del av akvifären kan redox och syrehalt fortfarande vara så låga att det normalt anses omöjligt för aeroba bakterier att agera. Det finns dock studier som visar att oxidation av VC

ändå kan ske, trots låg eller mycket låg syrehalt (0,1 mg/l) i akvifären. Detta är av stor betydelse för bedömning av omgivningspåverkan av VC nedströms kloretenförorenade akvifärer (Bradley, 2011; Bradley och Chapelle, 2011).

Mikroorganismer som i betydande omfattning kan oxidera VC finns i allmänhet i de allra flesta akvifärer där redox inte är alltför lågt. Däremot förekommer mikroorganismer som i betydande omfattning kan oxidera DCE mer begränsat. Ytterligare information ges i Bilaga 1.

4.5.2 Utan mikroorganismer (abiotiskt)

Abiotisk (kemisk) oxidation av klorerade alifater kan i princip endast erhållas genom tillsats av starka oxidationsmedel, t.ex. natriumbisulfat, permanganat och Fentons reagens. En del oxidationsmedel kan ges starkare oxidationsförmåga, s.k. aktivering, med tillsats av natriumhydroxid eller med tillsats av järnsulfat och citronsyra eller med extra värme (50 °C).

Kemisk oxidation har potential främst i hotspot i jordmatrisen. Nedbrytning i grundvattnet kan då uppkomma som en bi-effekt. Val av oxidant måste alltid baseras på laborietester på förorenat material från platsen. Olika oxidanter ger olika effekt på olika kloreten och kloreter samt olika jordtyper, TOC i jorden etc. (Crimi, 2010; Keijzer och Van Gool, 2007; Huling och Pivetz, 2006). Inför beslut att nyttja oxidationsmedel måste riskbedömning utföras (plats specifikt handhavande, negativ miljöpåverkan etc.). I Tabell 4.2 ges en sammanställning av olika oxidationsmedel och när de kan användas. Tabellen kan användas vid en inledande screening.

Tabell 4.2 Bedömning av olika oxidationsmedels användbarhet för nedbrytning av olika klorerade alifater (Keijzer *et al.*, 2012). Faktisk användbarhet beror bl.a. på platsspecifika faktorer i marken och riskbedömning. Bedömning: 1 = Utmärkt; 2 = Bra; 3 = Ok; 4 = Dålig; 5 = Fungerar inte.

Klorerad alifat a/	Katalyserad H ₂ O ₂		Per-manganat	Persulfat				Ozon och ozon + peroxid
	Fenton	Modifierad b/		Ingen aktivering	Termisk	Järn	Peroxid	
PCE	1	1	1	2	1	1	1	1
TCE	1	1	1	1	1	1	1	1
DCE	1	1	1	1	1	1	1	1
VC	1	1	1	1	1	1	1	1
TeCA c/	4	3	5	3	3	3	3	3
TCA d/	4	3	5	4	2	3	2	2
DCA	3	2	5	4	2	3	2	2
CA	3	2	5	4	2	3	2	2
CT	4	1	5	5	3	5	1	5
CF	4	2	5	5	5	5	2	4

a/ TeCA = Tetrakloretan; TCA = Trikloretan; DCA = Dikloretan; CA = Kloretan; CT = Tetraklormetan (koltetraklorid); CF = Triklormetan (kloroform).

b/ Modifierad Fenton använder järnkatalysatorn i kelaterad form.

c/ 1,1,1,2-TeCA och 1,1,2,2-TeCA.

d/ 1,1,1-TCA och 1,1,2-TCA.

4.5.3 Biotiskt – abiotiskt samspel

Vid nyttjandet av abiotisk (kemisk) oxidation, i kombination med biotisk nedbrytning, är det viktigt att först klarlägga hur samspelet kan ske samt den förväntade effekten av kombinationerna. Vanligtvis nyttjas kemisk oxidation innan den biologiska behandlingen i områden där den kemiska nedbrytningen har potential att gå snabbare än biotiskt alternativ. Som indikerats i föregående avsnitt fokuserar kemisk oxidation på områden med höga eller mycket höga föroreningshalter och/eller fri produkt. Kemisk oxidation är sällan aktuell för låga halter i plymen.

När oxidantmolekyler kommer i kontakt med föroreningsmolekyler sker oxidationen av föroreningen snabbt. Men för att det ska ske krävs god och snabb distribution av oxidanten till föroreningen. En sämre distribution leder till att oxidanten kan deaktiveras på vägen till föroreningen. Saneringseffekt och saneringstid är starkt beroende av permeabiliteten och naturligt material i akvifären. För att få en effektiv oxidation kan man därför behöva tillsätta oxidationsmedel vid flera tillfällen och under lång tid (veckor till år, beroende på oxidationsmedlets platsspecifika effektivitet).

Därefter kan det ta åtskilliga månader till år innan förutsättningarna i akvifären åter är gynnsamma för mikrobiell aktivitet. Olika oxidationsmedel ger olika kemiska och biologiska effekter i marken. De biologiska effekterna kan t.ex. innebära omfattande avdödning av befintliga bakterier (dvs. varierande grader av steril mark som i olika omfattningar kan återhämta sig).

Vilket tidsintervall som är nödvändigt mellan den abiotiska och biotiska behandlingen beror på flera olika faktorer. Det handlar både om hur fort den naturliga floran kan återhämta sig och hur lång tid det tar innan förhållandena är lämpliga för de mikroorganismer och substrat som man avser att tillsätta. Även andra förutsättningar som krävs för tillsatta mikroorganismers överlevnad och nedbrytningsaktivitet har betydelse. Exempelvis, om den efterföljande biotiska behandlingen avser att nyttja reduktiv deklorering så kan området behöva speciell förbehandling innan den biotiska behandlingen kan utföras. Behandlingen inriktas då på att åstadkomma en förändring från eventuellt extrema pH, maximalt oxidativa och betydande sterila förhållanden till normala pH, starkt reduktiva och bioaktiva förhållanden. Om man istället låter naturen återhämta sig själv kan det ta åtskilliga år innan lämpliga förutsättningar för mikrobiell behandling föreligger.

5. Analyser, utvärderingar, kostnader

Detta kapitel inleds med hur man kan använda kemiska analyser och indikatorer för utvärdering av nedbrytningsförlopp för klorerade etener, exemplifierat med bl.a. förändringar i dekloreringsgrader, molfraktioner och isotopfraktioner. I kapitlet ges därefter bl.a. exempel på mikrobiell provtagning, analyser och kostnader för dessa och utvärdering av analyserna. Kapitlet avslutas med information (som kan användas vid utvärdering) om dels hur man enkelt kan få indikation på fermentation, dels oönskad spridning av förorening och dels bakomliggande orsaker till s.k. stallning.

5.1 Kemiska analyser och indikatorer

I detta avsnitt diskuteras

- Massbalanser
- Dekloreringsgrad
- Förändringar av molfraktioner vs. dekloreringsgrader
- Isotopanalyser

5.1.1 Massflux och massbalans

I det följande ges en kortfattad beskrivning av massflux och massbalans. För mer djupgående information hänvisas till Sörensen och Persson (2008) och US DOE (2006b).

Massflux är massflöde per areaenhet. Genom att beräkna massflux kan man uppskatta mängden förorening som transporteras genom olika tänkta ytor vinkelrät placerade i t.ex. en grundvattensplym. Massbalans innebär i princip konservering av massa. Kombinationen massflux och massbalans, som avser t.ex. en förorening, fokuserar på att den massa som kommer in i ett system, t.ex. genom den tänkta uppströms placerade ytan, ska vara summan av vad som lämnar systemet, t.ex. nedströms placerad yta, den massa som ackumuleras i systemet samt den massa som omvandlas/bryts ned eller på annat sätt lämnar systemet på annat sätt än genom systemets nedströms placerade yta. Om den enda faktorn som förändrar massan inne i systemet är nedbrytning så ger skillnaden mellan de mängder som passerar dessa två ytor en indikation på vad som brutits ned i systemet. I Sörensen och Persson (2008) ges en enkel principiell beskrivning av detta.

Under senare tid har man ifrågasatt användning av massbalansberäkningar vid mikrobiell reduktiv deklorering i plymer förorenade av kloreter. Det har visat sig att de standardiserade beräkningarna kan ge opålitliga resultat. Det beror främst på att man relativt nyligen visat att VC och i viss mån DCE kan genomgå signifikant oxidation under mikroaeroba förhållanden (se om oxidation av VC och DCE i Bilaga 1). Dessa föreningar kan även relativt lätt förångas vid provtagning, provtransport och analys. I massbalansberäkningarna kommer dessa förluster då felaktigt att betraktas vara orsakade av reduktiv deklorering (Stroo *et al.*, 2013).

Dessutom kan kloreter brytas ned abiotiskt varvid helt andra produkter bildas än vid ordinarie mikrobiell reduktiv deklorering. Vanligtvis bildas då acetylen. Acetylen kan analyseras, men eftersom acetylen är instabil/mycket lätt nedbrytbar så är den inte någon pålitlig indikator för abiotisk nedbrytning (ESTCP, 2008). Om sådan abiotisk deklorering inkluderas i en massbalans så kan utfallet bli osäkert.

5.1.2 Dekloreringsgrad av klorerade etener

Mikrobiell reduktiv deklorering av klorerade alifater går enligt förbestämda reaktionsprocesser (exempelvis, för klorerade etener: $\text{PCE} \rightarrow \text{TCE} \rightarrow \text{DCE} \rightarrow \text{VC} \rightarrow \text{eten/etan}$). Med hjälp av molmässiga halter av dessa föreningar kan man få en indikation på hur långt i denna process som reduktionen skett. Detta kan göras genom enkel beräkning av s.k. dekloreringsgrad, DKG. Ingångsvärdena, dvs. föroreningshalterna, får man genom analys av grundvattenprov.

En ökning av DKG är dock inte något bevis på en ökning av mikrobiell deklorering. Exempelvis kan ökningen bero på att halt av ursprungsföreningen eller av mellanprodukter minskat av andra orsaker, t.ex. genom kemisk deklorering, utspädning, fastläggning eller gasavgång. Förändring i DKG ger dock bra indikation på den totala haltförändringen. DKG kan med fördel jämföras med procentuell relativ förändring i molfraktion av varje enskild produkt i dekloreringskedjan. Kombinationen och dess förändringar över tid ger då en tydligare bild av den pågående reduktionsprocessen (Figur 5.1).

Bedömning av hur långt dekloreringen har gått kan tydliggöras genom att, tillsammans med DKG, visa den procentuella relativa förändringen av enskilda föreningars molfraktioner (kopplingen beskrivs i Avsnitt 5.1.3). Om man till detta kopplar haltbestämning av speciella mikroorganismer och speciella mikrobiella gener, så kan sådant sammantaget underlag ge ännu bättre stöd åt tolkningen huruvida det pågår mikrobiell nedbrytning eller inte. Mikrobiella analyser och utvärderingar beskrivs i Avsnitt 5.2.2. Om man därutöver kompletterar med analys av kolisotoper erhålls ett fullödigt bevis på mikrobiell deklorering. Isotopanalyser beskrivs i Avsnitt 5.1.4

För att beräkna dekloreringsgrad (DKG) behövs molhalter av varje enskild ingående förening i reaktionskedjan. Molhalter beräknas utifrån analyserade massbaserade halter och enskilda föreningars molvikter, enligt (exemplifierat för halt i vatten av förening A):

Molhalt av A ($\mu\text{mol/l}$) = [A] = Analyserad halt av A ($\mu\text{g/l}$) / Molvikt av A ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

Molvikt för aktuell förening A erhålls i tabellverk.

I alla ekvationer nedan används molhalten av varje angiven förening, beräknad ur ovanstående ekvation.

Om den ursprungliga föroreningen utgörs av PCE så beräknas dekloreringsgraden enligt (SGF, 2011; Middeldorp *et al.*, 2002):

$$\text{Dekloreringsgrad, DKG (\%)} = \frac{([\text{TCE}] + 2 \cdot [\text{DCE}] + 3 \cdot [\text{VC}] + 4 \cdot [\text{Eten}] + 4 \cdot [\text{Etan}])}{4 \cdot ([\text{PCE}] + [\text{TCE}] + [\text{DCE}] + [\text{VC}] + [\text{Eten}] + [\text{Etan}])} \cdot 100$$

Följande överslagsmässiga tolkningar av utfallet av ekvationen kan göras, med reservation för antagandet att haltförändringarna beror på deklorering.

- Om DKG är lägre än 26 % så är huvudreaktionerna fokuserade på PCE, dvs. det finns mycket kvar av moderprodukten och det är den som mikroorganismerna främst deklorerar.
- Om DKG ligger i intervallet 26 % – 50 % så är dekloreringen främst fokuserad på TCE.
- Ligger DKG i intervallet 51 % – 75 % så är dekloreringen fokuserad huvudsakligen på DCE.

- I intervallet 76 % – 100 % DKG är dekloreringen i huvudsak fokuserad på VC.
- Vid DKG = 100 % har alla de klorerade etenerna, inklusive VC, deklorerats.

Principiellt kan alltså det procentuella värderesultatet tolkas så att ju högre procentuellt värde på DKG desto längre har den totala dekloreringen gått.

Om ursprungsförening istället är TCE beräknas DKG med följande ekvation (Bjerg *et al.*, 2006):

$$\text{Dekloreringsgrad, DKG (\%)} = \frac{([\text{DCE}] + 2 \cdot [\text{VC}] + 3 \cdot [\text{Eten}] + 3 \cdot [\text{Etan}])}{3 \cdot ([\text{TCE}] + [\text{DCE}] + [\text{VC}] + [\text{Eten}] + [\text{Etan}])} \cdot 100$$

Utfallet från denna ekvation kan överslagsmässigt tolkas enligt följande.

- Om DKG är under 34 % så är huvudreaktionerna fokuserade på TCE, dvs. det finns (mycket) kvar av moderprodukten och det är den som mikroorganismerna främst deklorerar.
- Om DKG ligger i intervallet 34 % – 67 % så är dekloreringen främst fokuserad på DCE.
- Ligger DKG i intervallet 68 % – 100 % så är dekloreringen främst fokuserad VC.
- Om DKG = 100 % har även allt VC deklorerats.

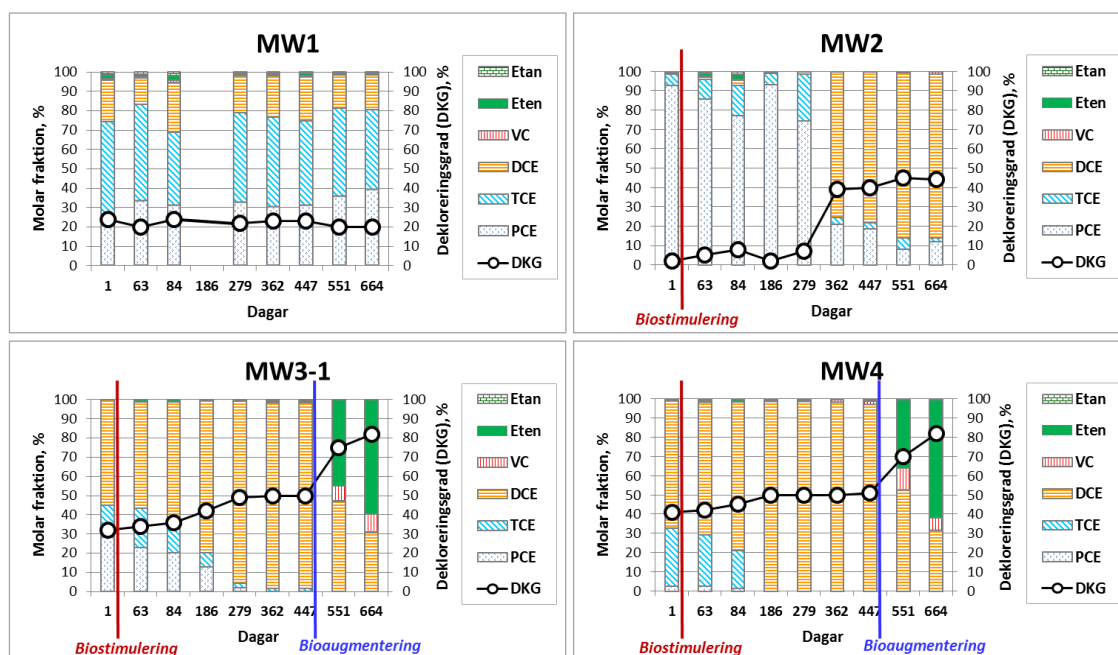
5.1.3 Förändringar av molfraktioner vs. dekloreringsgrader

Genom att studera dekloreringsgrad (DKG) tillsammans med aktuella molfraktioner (MF) så kan man få en uppfattning om hur långt dekloreringen gått. Detta kan t.ex. göras i ett diagram. Molfraktionen (MF) beräknas med molbaserade halter. I det fall PCE är ursprungsförening beräknas MF enligt följande, exemplifierat för *cis*-DCE, där alla halter är molbaserade:

$$\text{MF (\%)} = \frac{[\textit{cis}\text{-DCE}]}{[\text{PCE}] + [\text{TCE}] + [\textit{cis}\text{-DCE}] + [\textit{trans}\text{-DCE}] + [\text{VC}] + [\text{Eten}] + [\text{Etan}]} \cdot 100$$

Om ursprungsföreningen är TCE stryks [PCE] i nämnaren.

I Figur 5.1 ges exempel på hur tidsmässig förändring av deklorering kan beskrivas med kombination av molfraktioner (staplar) och dekloreringsgrad (linjer med punkter). Av figuren fås att den genomförda biostimuleringen (mörkröd vertikal linje) resulterade i ökad, och så gott som fullständig, haltreduktion (sannolikt reaktiv deklorering) av de högklorerade etenerna PCE och TCE. Fortsatt deklorering av DCE avstannade därefter fram till bioaugmentationen (blå vertikal linje) som i sin tur resulterade i fortsatt haltreduktion (deklorering) till eten.



Figur 5.1 Exempel på tidsmässig förändring av molfraktioner (staplar) och dekloreringsgrad (DKG; svart linje med ringar) i fyra olika grundvattenrör i samma pilotstområde. MW1 är bakgrundspunkt, MW2 endast biostimulation, MW3 och MW4 biostimulation med efterföljande bioaugmentation. Mörkröd vertikal linje: tid för biostimulering och blå vertikal linje: bioaugmentation (data från Branzén och Ländell, 2017).

5.1.4 Isotopanalyser

Mikrobiell nedbrytning är endast en del av alla de processer i ett förorenat område som sammantaget minskar halter och mängder av förorening. Om myndighet eller problemägare kräver bevis på att mikrobiell nedbrytning sker i tillräcklig omfattning men att givna bevis (halter av nedbrytningsprodukter, mikroorganismer etc.) är otillräckliga så kan de kompletteras med isotopanalyser.

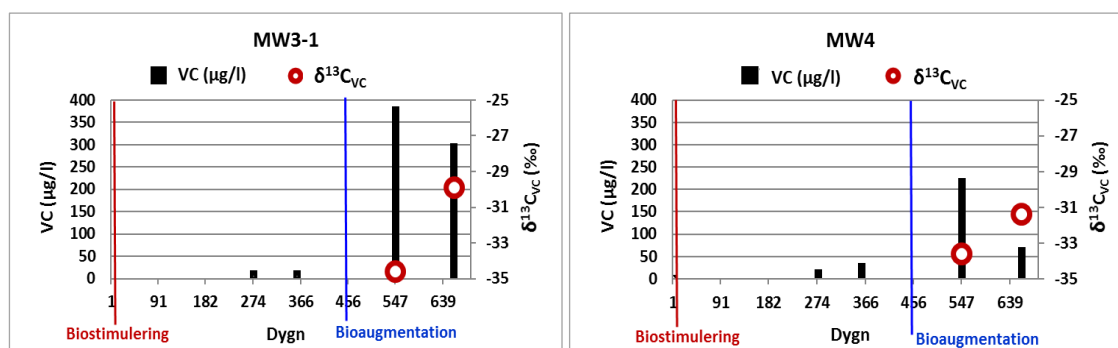
I föregående avsnitt beskrevs hur förändringar av molfraktioner och dekloreringsgrad kan utvärderas och hur dessa faktorer kan ge stark indikation på nedbrytning och dess omfattning. Därtill ger en ökning av halten *cis*-DCE, relativt halten *trans*-DCE, en tydlig direkt indikation på mikrobiell nedbrytning (eftersom mikroorganismer föredrar att bilda *cis*-DCE vid dekloreringsreaktion). Men exakt hur stor den mikrobiella andelen av den totala haltreduktionen är går inte att klargöra utan ämnesspecifik isotopanalys (CSIA, compound specific isotope analysis). För att undersöka detta kan isotopanalyser av kolisotoper ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) analyseras. Vid behov kan de kompletteras med analys av klorisotoper ($^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$) och/eller väteisotoper ($^2\text{H}/^1\text{H}$).

Vid mikrobiell nedbrytning av kolföreningar föredrar mikroorganismerna att bryta upp bindningar till kolisotopen ^{12}C före bindningar till kolisotopen ^{13}C . Isotopanalys av ursprunglig förening och dess nedbrytningsprodukter kan därmed ge information om huruvida föreningen brutits ned mikrobiellt samt i vilken omfattning. Isotopkvoten (ratio) betecknas $\delta^{13}\text{C}_x$ (‰), där x är den klorerade föreningen eller en samling av föreningar i en reaktionskedja. Förhållandet mellan de olika isotoperna (kvot, ratio) kan beräknas i princip för alla klorerade lösningsmedel. För dekloreringsreaktion av klorerade etener kan kvoten beräknas för varje enskild klorerad eten, t.ex. för VC ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VC}}$ (‰)) och för summan av alla kloreter ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CEs}}$ (‰)). Isotopförhållandet $\delta^{13}\text{C}$ (‰) för X kan 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 aktuellt prov relateras till. Av ekvationen ovan fås att reduktiv deklorering av en 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 två olika provpunkter ger att ursprunglig TCE i det förra fallet (-15‰) har brutits ned betydligt mer än i det senare fallet (-30‰).

I Figur 5.2 exemplifieras bevis på att VC producerats via mikrobiell deklorering. $\delta^{13}\text{C}$ uppvisar markant ökning efter bioaugmentation, samtidigt som VC-halten ökat. De relativt låga värdena på $\delta^{13}\text{C}$ vid första provtagningen efter bioaugmentation kan ha orsakats av att dekloreringen då ökade markant av både högklorerade (PCE, TCE) och lågklorerade etener (*cis*-DCE, VC). Värdena på $\delta^{13}\text{C}$ vid andra provtagningen efter bioaugmentation var avsevärt högre. De indikerar att den dekloreringen av VC då var kraftigare än dess samtida produktion (från dekloreringen av DCE).



Figur 5.2 Utveckling av VC-halter i två grundvattenrör efter dels biostimulering, dels bioaugmentation samt kolisotop ratio för VC efter augmentationen (data från Branzén och Ländell, 2017).

Med isotopundersökningar är det även möjligt att göra en prognos av hur snabbt den mikrobiella dekloreringen kommer att ske. Detta förutsätter att man har tillräckligt antal prov och tillräckligt höga halter. Exempel på utförlig utvärdering av isotopundersökningar ges i bilaga till Branzén och Ländell (2017).

Under vissa förhållanden, då det samtidigt med mikrobiell nedbrytning pågår omfattande kemisk/abiotisk nedbrytning i närvaro av järnsulfid (FeS) (eventuellt även annat/andra ämnen t.ex. nollvärt järn), kan abiotisk nedbrytning orsaka svårigheter i den isotopbaserade bedömningen av mikrobiell nedbrytning (US EPA, 2008).

Isotopanalyser (CSIA) har hittills inte använts internationellt i någon större utsträckning för att klargöra pågående deklorering. Istället tycks vanliga kemanalyser tillsammans med biologiska genanalyser ha fått ökad användning. Orsaken är förmodligen att CSIA-analyser fortfarande utförs av ett begränsat antal internationella kommersiella laboratorier samt att utvärderingen kan vara komplicerad.

I december 2012 var kostnaden vid ett europeiskt analysföretag ca 2 500 SEK/kolisotopanalys av max fem klorerade etener i ett grundvattenprov. Kostnaden för klorisotopanalys var avsevärt dyrare; för enbart PCE var kostnaden ca 3 500 SEK/vattenprov. Minst 5-20 µg/l krävdes för kolisotopanalys och minst 5-10 µg/l för klorisotopanalys. Expertbedömning från samma företag kostade ca 25 000 SEK för en sammantagen kvalitativ och kvantitativ utvärdering av bionedbrytningsprocesser och eventuellt olika föroreningskällor, baserat på kolisotoper i sexton vattenprov (samt ytterli-

gare ca 8 000 SEK om man önskade lägga till utvärdering baserat på klorisotoper i samma prover), allt exklusive provtagning och transport.

5.2 Mikrobiella analyser och indikatorer

I detta avsnitt diskuteras

- Mikrobiella provtagare
- Analys av mikroorganismer och gener
- Kostnader för mikrobiella analyser
- Indikation på fermentationsprodukter
- Spridning av förorening orsakad av injektion och bakterieaktivitet
- Stallning

5.2.1 Mikrobiella provtagare

Det finns idag tre huvudsakliga provtagningsmetoder för analys av den mikrobiella statusen i en akvifär som kan kopplas till bl.a. mikrobiell deklorering av klorerade etener. De är:

- Vattenprov (tas vanligtvis i befintliga grundvattenrör).
- Bio-Trap® (Ordinarie Bio-Trap®/Avancerad Bio-Trap®) och BacTRAP. Alla är passiva provtagare med syntetiska sorbenter; placeras i grundvattenrör.
- Jord Mesocosm. Passiv provtagare med platsspecifik jord som sorbent; placeras i grundvattenrör. Mesocosm är ett kontrollerat testsystem placerat utomhus.

Vattenprov tas enligt rekommendationer från valt analysföretag, placeras i behållare erhållna från analysföretaget och transporteras i enlighet med analysföretagets rekommendationer.

Bio-Trap® (MI, 2015e) är en passiv provtagare som sänks ned i grundvattnet och tas upp för analys efter 30-90 dagar. Den består av en öppen plastbehållare med speciella kulor där bakterier kan växa (MI, 2015e; Stroo *et al.*, 2013).

BacTRAP (Kästner *et al.*, 2006) har en något annorlunda design än Bio-Trap® och har ett annat innehåll/substrat för bakterietillväxt på sorbenten.

Oavsett provtagningsmetod så måste proverna analyseras snarast efter provtagning. Analys av gener i RNA kräver vanligtvis max ca ett dygn mellan provtagning och analys, medan motsvarande i DNA kan tillåtas ta något längre tid. Om tiden mellan provtagning och leverans av proven till laboratoriet tillåter så bör de mikrobiella analyserna i första hand utföras på RNA och i andra hand på DNA. Mer information kan fås av det aktuella analysföretaget.

En variant av Bio-Trap®, kallad avancerad Bio-Trap®, har upp till två speciella tillsatsenheter. Med hjälp av tillsatsenheterna kan man undersöka effekten av biostimulering och bioaugmentation (Sublett *et al.*, 2011; Larsson *et al.*, 2014). En av de två tillsatsenheterna kan laddas med fermenterbar kolkälla medan den andra kan laddas med bakterier (och kolkälla om så önskas). Tillsatsenheterna kan dessutom laddas med speciella delenheter som sorberar kemiska föreningar från grundvattnet, t.ex. klorerade etener. Genom att jämföra resultatet från kemiska analyser av innehållet i enheterna kan en indikation på effekt av tänkt bioaugmentation och/eller biostimulering fås.

Jord Mesocosm finns i olika utföranden. För undersökning av mikrobiell deklorering i grundvattenrör består den vanligtvis av ett flertal mindre, delvis permeabla, behållare. I dessa placeras jordprov från akvifären. Jordproven tas vanligtvis i samband med att grundvattenrören installeras. Jordproven får inte komma i kontakt med luft/syre. Speciella provbehållare fylls (under anaeroba förhållanden) med upptagen jord och ett lämpligt antal sänks ned i grundvattenröret. I varje grundvattenrör placeras dessa fyllda behållare intill/under varandra. Efter en förbestämd tid tas behållarna upp för analys (Van Nooten *et al.*, 2010; CityChlor, 2013b; Branzén och Ländell, 2017).

Jord Mesocosm placeras i grundvattenrör på lämpligt avstånd nedströms den/de punkt/-er där injektion i form av biostimulering och/eller bioaugmentation utförs *in situ*. Om det av någon anledning inte är möjligt att utföra injektioner i akvifären kan mesocosmerna utsättas för biostimulering och/eller bioaugmentation på laboratoriet. Därefter placeras de i grundvattenrör i det valda området. De tas då upp efter några månader och analyseras kemiskt och mikrobiellt.

De passiva provtagarna ger en sammantagen ”summa”-bild av mikrobiologin för den tid de varit installerade. Vattenprov ger istället en kemisk och mikrobiell ögonblicksbild vid det aktuella provtagningstillfället. Om den mikrobiella situationen i grundvattnet förändras snabbt, kan det vara lämpligare med vattenprov. Oavsett om passiva mikrobiella provtagare används eller inte så behöver kemisk analys av vattenprov alltid utföras samtidigt för att få information om föroreningsstatus och om denna förändras över tid.

Provtagning av grundvatten är betydligt billigare än provtagning med passiva provtagare (kostnad för själva utrustningen, utplaceringen och för mesocosmerna dessutom för jordprovtagning och för att ladda behållarna med denna jord). De kommersiella laboratorierna levererar idag kostnadsfritt provkärl för mikrobiell grundvattenprovtagning, i motsats till de passiva provtagarna som kan kosta tusentals kronor (Avsnitt 5.2.3). Dessutom kan transportkostnaden för passiva provtagare till laboratorium bli betydande om endast vissa utländska laboratorer kan erbjuda analys av dessa.

I Figur 5.3 och Figur 5.4 visas exempel på hur halter av kloreter och eten/etan kan förändras med tiden. I figurerna redovisas också halterna av *Dhc* och speciella gensekvenser i vattenprov, Bio-Trap[®] och Jord Mesocosm. Dataunderlaget, som är begränsat till ett pilottest, indikerar att vattenprov kan uppvisa snabbast respons på haltförändringar av *Dhc* och av dess gensekvenser i grundvattnet relativt haltvariationer av lågklorerade etener (VC) och eten/etan i detta grundvatten. Mesocosmerna tycks ge långsammast respons.

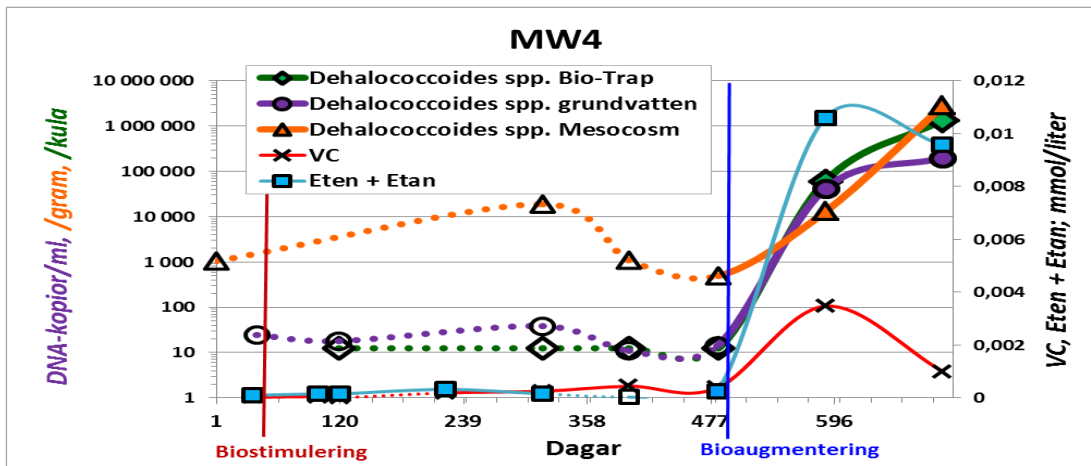
Om den tillsatta kolkälla fermenteras relativt snabbt (som var fallet i det nämnda pilottestet) kan detta innebära relativt snabba haltförändringar av *Dhc* och dess gener samt av de klorerade etenerna. Då är vattenprov som analyseras både mikrobiellt och kemiskt att föredra, framför de passiva provmetoderna. Det innebär i sin tur att vattenprovtagningar bör ske ofta för att förändringarna ska kunna fångas upp. För en del andra bakterietyper än *Dhc* kan eventuellt Bio-Trap[®] eller Jord Mesocosm ge något bättre respons, framför allt vid låga halter.

5.2.2 Analys av mikroorganismer och gener

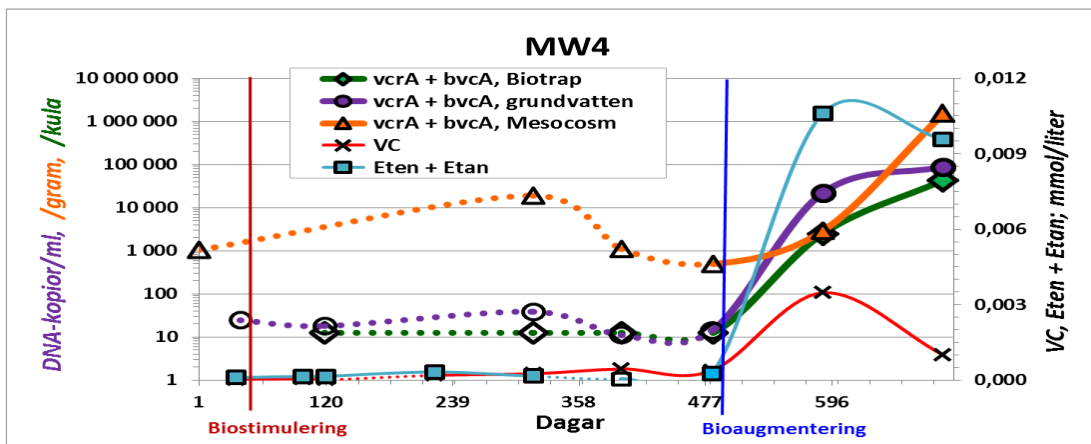
Det är relativt lätt att genetiskt identifiera och kvantifiera mikroorganismer som tillhör släktet *Dehalococcoides* (*Dhc*). Det är endast ett mindre antal stammar inom detta släkte som har förmågan att deklorera lågklorerade etener. Därför har man på senare tid fokuserat på att identifiera de gener i dessa stammar som är den bakomliggande orsaken till denna unika förmåga. Några av dessa gensekvenser kan idag analyseras kommersiellt. Därför är det numera rutin att analys av *Dhc* kompletteras med analys av gensekvens.

I Bilaga 1 ges information om de idag kända mikroorganismer som kan deklorera olika klorerade alifater. Där beskrivs de gener som kan kopplas till deklorering av främst lågklorerade etener, liksom de gener som är förknippade med andra dekloreringsprocesser. Observera att det endast är ett fåtal av de gener som man idag känner till att vara kopplade till deklorering av DCE och VC som hittills kan analyseras och kvantifieras på kommersiella laboratorier. Dessa gener benämns *bvcA* och *vcrA*. Det innebär att även om dessa gener inte detekteras i ett grundvattenprov så är det inte bevis på att mikrobiell deklorering av DCE och VC inte sker. Däremot, om de detekteras i tillräcklig halt i DNA eller RNA så föreligger potential för, respektive reell, produktion av enzym som kan utföra fullständig deklorering av de lågklorerade etenerna. Detta förklaras mer ingående i Bilaga 1.

I Figur 5.3 ges exempel på uppmätta halter av *Dhc* i grundvattenprov, relativt halten VC och halten eten+etan. I Figur 5.4 visas istället halten av ovan nämnda genskvenser relativt halt av VC. Vid jämförelse av Figur 5.3 med Figur 5.4 fås att de detekterade halterna av *Dhc* är i samma storleksordning som motsvarande halter av de utvalda generna. Detta indikerar att en stor andel av de detekterade *Dhc* var av den stam, eller de stammar, som har genetisk potential att deklorera klorerade etener.



Figur 5.3 Halt av *Dhc* i grundvatten, Bio-Trap® och mesocosmer relativt VC och eten + etan (i vatten) efter dels biostimulering, dels bioaugmentation (samma datum, provnivå och grundvattenrör) (data från Branzén och Ländell, 2017). Ofyllda mätpunkter motsvarar halter under rapporteringsgräns.



Figur 5.4 Halt av utvalda genskvenser i grundvatten, Bio-Trap® och mesocosmer relativt halt VC och eten + etan efter dels biostimulering, dels bioaugmentation (samma datum, provnivå och grundvattenrör) (data från Branzén och Ländell, 2017). Ofyllda mätpunkter motsvarar halter under rapporteringsgräns.

Genanalyserna utfördes på DNA. Fastän DNA-analys endast ger potential för produktion av de önskade enzymerna (i motsats till analys av RNA som ger pågående enzymproduktion) så ger kopplingen mellan de ökade halterna av generna och de ökade halterna eten och etan, samt temporärt ökad halt av VC, stark indikation på att generna aktivt kodade för produktion av de önskade enzymerna. Eftersom denna deklorering endast kan utföras av speciella stammar av *Dhc* ger kopplingen även indikation på att detekterade *Dhc* till stor del bestod av dessa stammar.

Internationella erfarenheter har visat att det ofta krävs att *Dhc* föreligger med halter över vissa nivåer för att effektiv och fullständig deklorering ska erhållas. Därför är det viktigt med en kvantitativ analys och en jämförelse med dessa haltnivåer när man ska bedöma behovet av bioaugmentering. I Tabell 5.1 tolkas detekterade halter av *Dhc* i grundvattenprov visavi potential för fullständig deklorering av klorerade etener (dvs. produktion av eten från VC).

Utöver analys av *Dhc* rekommenderas analys av gensekvenserna *vcrA* och *bvcA*. Minst en av dessa bör föreligga i tillräcklig koncentration, Tabell 5.2. Därtill bör dessa analyseras i RNA, förutsatt att tid mellan provtagning och transport till analyslaboratoriet så tillåter (se Avsnitt 5.1).

Tabell 5.1 Analyserade halter av *Dehalococcoides* 16S rRNA/liter vattenprov och tolkning som avser sannolik deklorering (ESTCP, 2011; Lu *et al.*, 2006). Observera att kompletterande kvantifiering och bedömning av specifika gener, Tabell 5.2, rekommenderas. Se kommentarer till denna tabell i text direkt efter Tabell 5.2.

<i>Dehalococcoides</i> 16S rRNA	Tolkning
< 10 ⁴ genkopior (celler)/liter	Låg halt av <i>Dhc</i> (<i>Dehalococcoides</i> sp.). Ringa potential för effektiv deklorering av lågklorerade etener. Signifikant produktion av eten är osannolik.
10 ⁴ – 10 ⁶ genkopior (celler)/liter alternativt 1/ 10 ⁴ – <10 ⁷ genkopior (celler)/liter	Måttlig halt av <i>Dhc</i> (<i>Dehalococcoides</i> sp.). Halter i detta intervall har endast ibland kunnat kopplas till deklorering av lågklorerade etener och produktion av eten. Eventuellt nås inte saneringsmål inom acceptabel tid.
> 10 ⁶ genkopior (celler)/liter alternativt 1/ ≥ 10 ⁷ genkopior (celler)/liter	Hög halt av <i>Dhc</i> (<i>Dehalococcoides</i> sp.). Stor potential för effektiv deklorering av lågklorerade etener. Signifikant produktion av eten är sannolik.

1/ Se inledning av avsnitt 3.4.1 i Bilaga 1

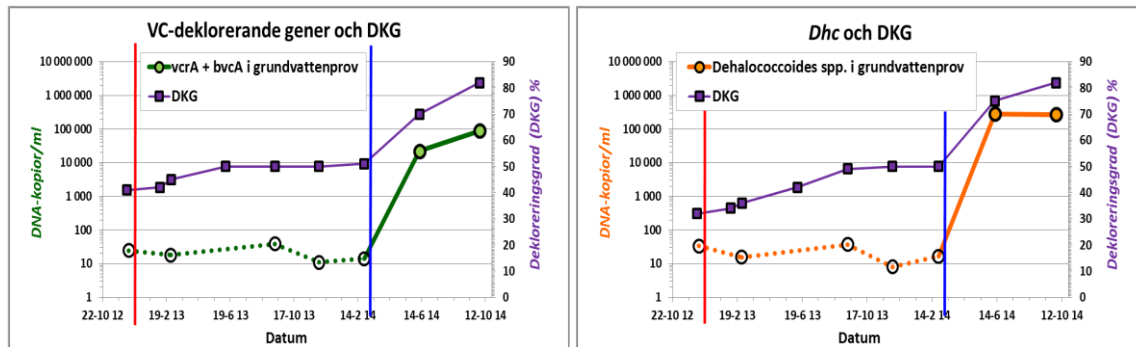
Tabell 5.2 Analyserade halter av generna *vcrA* och *bvcA* i vattenprov och tolkning vad gäller potential för deklorering (van den Zaan *et al.*, 2010), (MI, 2015f).

<i>vcrA</i> och <i>bvcA</i>	Tolkning
> 10 ⁶ genkopior/liter	Indikerar hög potential för deklorering av VC
< 10 ⁷ genkopior/liter	Potential för ofullständig deklorering inom acceptabel tid 1/

1/ Acceptabel tid: Den maximala tid som ansvarig myndighet, i samråd med markanvändare och entreprenör, bestämt inom vilken saneringsmålen ska vara uppnådda. För FNS av kloretenförörenad grundvattenplym bör målen kunna uppnås inom 1–5 år, beroende på hur allvarlig föroreningsituationen är.

I Avsnitt 5.1.2 beskrevs dekloreringsgrad, DKG. DKG baseras på den totala sammantagna haltförändringen, alltså inte enbart på den del av DKG som är orsakad av mikrobiell nedbrytning. Genom att utvärdera beräknad DKG tillsammans med rapporterade halter av speciella mikroorganismer och speciella mikrobiella gener kan man bedöma om det pågår en mikrobiell nedbrytning. I Figur 5.5a-b ges exempel på erhållna relationer över tid i ett och samma grundvattenrör mellan DKG, haltsumman av generna *vcrA* och *bvcA* och halten *Dhc* (*Dehalococcoides* spp.).

I exemplen har mikrobiella analyser av grundvatten sammantaget gett tydliga indikationer på att det efter bioaugmentationen pågår mikrobiell deklorering av lågklorerade etener samt att denna deklorering utförs av enzym i *Dhc*. Om man önskar ännu starkare indikationer på att mikrobiell deklorering sker kan även isotopanalyser utföras.



Figur 5.5 a-b Exempel på haltförändring av utvalda genskvenser och *Dhc* i grundvatten, relativt förändring av dekloreringsgrad (DKG) efter dels biostimulering (röd vertikal linje), dels bioaugmentation (blå vertikal linje). Ofyllda punkter (och punktlinjer) = halter under rapporteringsgräns. Data från Branzén och Ländell, 2017.

5.2.3 Kostnader för mikrobiella analyser

Angivna kostnader nedan är noterade av SGI under Alingsåsprojektet (Branzén och Ländell, 2017) och kopplade till analyser utförda vid europeiska och amerikanska kommersiella analysföretag. Det fanns då (2014) inte något svenskt analysföretag som kunde utföra de nedan angivna mikrobiella analyserna. Enligt information från Hallbeck (2016) kommer dock dessa analyser sannolikt att erbjudas i Sverige inom en snar framtid. Förutom nedan givna kostnader ges ytterligare kostnadsinfo gällande fullskala i Bilaga 1.

Kostnader för kvantitativ analys, utförd 2014 vid europeiskt laboratorium, av ett vattenprovs totala innehåll av bakterier, *Geobacter* spp., *Dhc*, *Dehalobacter restrictus*, *Dehalobacter* sp. strain TCA1, *Desulfuromonas* spp., samt av DNA-generna *tceA*, *vcrA*, *bvcA*, *dsrA*, *dsrB* och *mcrA*, låg i intervallet 6 500–7 000 SEK, exklusive VAT och transporter.

En Jord Mesocosm kostade då ca 11 000 SEK vid samma laboratorium, exklusive VAT och transport. I denna kostnad ingick behållare samt laddning av akvifärmaterial (jord) i behållaren under anaeroba förhållanden. Behållaren, som laboratoriet själv tillhandahöll, bestod av speciellt permeabelt material. I kostnaden ingick därtill analys i samma omfattning som för vattenprov ovan. Kostnaden var exklusive borring/upptag av prov/hel lufttät borrhärla, transport av borrhärla i lufttät behållare till laboratoriet, transportkostnad av färdiggjorda Jord Mesocosm från laboratoriet till fält samt därefter från fält åter till laboratoriet för analys.

En preparerad Bio-Trap[®], samt mikrobiell analys som omfattade ungefär detsamma som för vattenprovet ovan, kostade vid ett amerikanskt laboratorium ca 10 000 SEK år 2014, exklusive VAT och transporter.

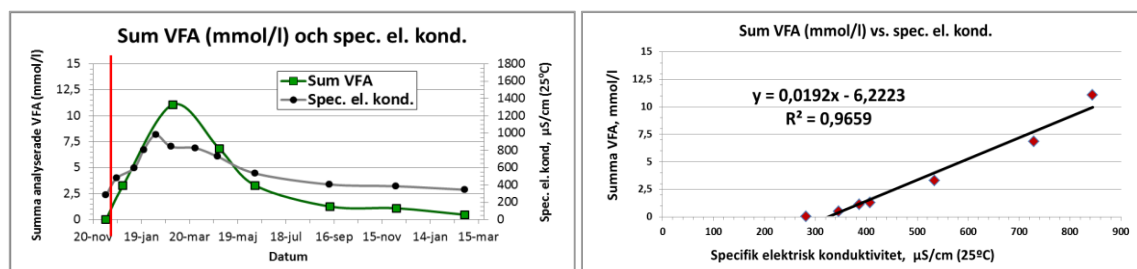
Det kan tilläggas att om nedbrytningstester skulle ha utförts på laboratorium (istället för som nu i fält) hade kostnaderna kunnat bli avsevärt högre. Laboriemässiga microcosm- (ekosystem i labbskala) studier på akvifärmaterial med vilket man vill undersöka potential för deklorering, med och utan biostimulering och bioaugmentation, kostade 2013 i USA 70 000 - 200 000 SEK. Sådana studier var dock då inte standardiserade och man ansåg att de var på det innovativa stadiet (Krug *et al.*, 2013).

5.2.4 Indikation på fermentationsprodukter

En viktig del i förstärkt mikrobiell reduktiv deklarerad av klorerade lösningsmedel i en akvifär är närvaro av löst väte. Detta väte kan fås genom fermentation av tillförda substrat, s.k. biostimulering. Beskrivning av fermentation ges i Bilaga 1. Nedan beskrivs hur man indirekt kan få en indikation på hur fermentationen fortlöper.

Vid fermentation av tillförda substrat bildas flyktiga fettsyror (VFA, Volatile Fatty Acids). I vissa fall kan även själva substratet innehålla VFA. Direkt respons på tillsatta, och/eller bildade, VFA fås vanligtvis genom kvantitativ analys. Antalet provtagningar av grundvatten och analyser av VFA-innehåll kan ibland reduceras och delvis ersättas av mätningar av den elektriska konduktiviteten direkt i provpunkten.

Förändring av specifik elektrisk konduktivitet har, efter injektion av biostimulerande kolkälla/substrat, visat sig kunna indikera förändring av halten fettsyror. Fettsyrorna kan vara tillsatta eller bildade genom fermentation. I Figur 5.6 ges ett exempel på sambandet halt fettsyra – elektrisk konduktivitet. Figuren visar exempel på förändringen i halt fettsyror, relativt uppmätt elektrisk konduktivitet, i ett grundvattenrör efter att en blandning av fermenterbara kolkällor tillsatts i injektionspunkt, placerad några få meter uppströms grundvattenröret (Branzén och Ländell, 2017). Korrelationen beror sannolikt på att de bildade fettsyrorna till stor del föreligger som syror (som kan ge ökad jonstyrka) vid de pH-förhållanden som vanligtvis genereras vid fermentation.



Figur 5.6 Vänster: Halt av analyserade flyktiga fettsyror (VFA) och specifik elektrisk konduktivitet i ett grundvattenrör. Röd vertikal linje motsvarar tid för biostimulering. Höger: Trendlinje med indikation på linjärt samband (data från Branzén och Ländell, 2017).

Resultatet i Figur 5.6 styrks av Aceves-Lara *et al.* (2012) som visade att det finns linjära samband mellan utvecklingen av specifik elektrisk konduktivitet, uppmätt med fältinstrument i flödescell, och summahalt av analyserade flyktiga fettsyror (VFA) i vattenprov från samma provpunkt. Både i det, i figuren ovan, refererade SGI-projektet och i studien redovisad av Aceves-Lara *et al.* (2012) är VFA bildade genom fermentation av främst melass. Det är oklart om sådana linjära samband (Figur 5.6 höger) kan fås oavsett vilken fermenterbar kolkälla som väljs. Dessutom är det oklart vid vilka halter av VFA som relationen upphör (i Figur 5.6 låg den vid VFA <1 mmol/l, kopplat till spec. elektrisk konduktivitet <400 µS/cm).

Undersökning av fältparametrar (bl.a. elektrisk konduktivitet) brukar normalt utföras i samband med provtagningar av grundvattnet. Undersökning av haltförändringar av VFA kan vara styrande när man ska bedöma behov av ytterligare biostimulering. Ju snabbare man har underlaget desto snabbare kan beslut tas. Det kan ta flera dagar eller veckor att erhålla analys svar för innehåll i grundvatten. Dessutom är analyskostnaden för VFA inte försumbar. Därför är det en fördel om VFA-halten kan indikeras med mätning av specifik elektrisk konduktivitet. Detta förutsätter att man har fastställt att det finns en tydlig platsspecifik korrelation mellan VFA-halt och specifik elektrisk konduktivitet.

5.2.5 Spridning av förorening orsakad av injektion och bakterieaktivitet

Injektion *in situ* av vätskor (biostimulerande eller bioaugmenterande) kan mobilisera förorening. Sådan mobilisering kan ske t.ex. från jordmatris ut i vattenfasen. I Figur 5.7 ges exempel på förändring av totalhalter av kloreter dels intill injektionspunkterna och dels nedströms desamma, före och efter utförda injektioner intill provpunkterna. De biostimulerande injektionerna utfördes under några dagar med en blandning av Newman Zone[®] (soyaböolja, ytaktiva ämnen, acetat, vatten; allt livsmedelsklassat) och melass (pesticidfri). Bioaugmentationen utfördes med den kommersiellt tillgängliga bakteriekulturen KB-1[®] (Branzén och Ländell, 2017).

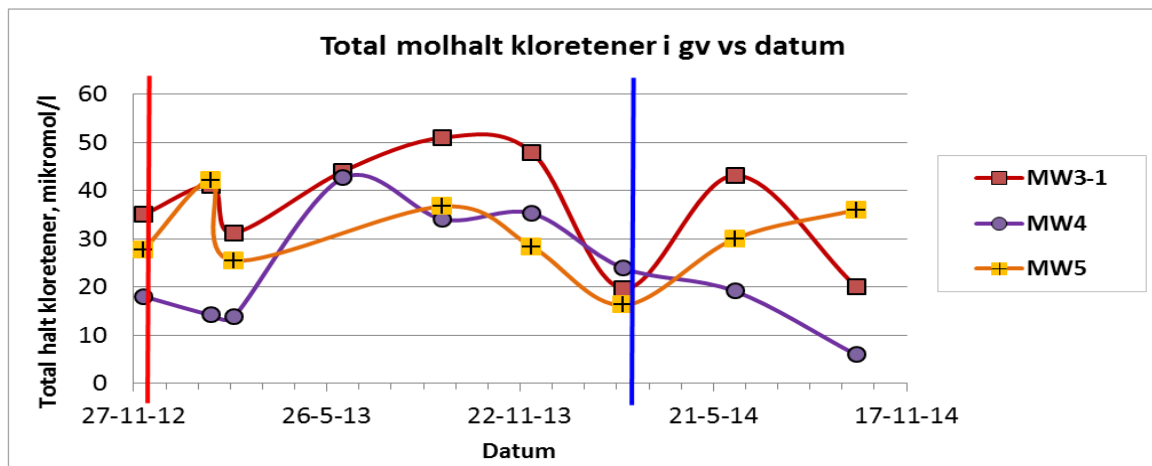
Av Figur 5.7 framgår att direkt efter biostimuleringen erhöles en mindre haltökning i grundvattnet inom försöksområdet (MW3-1) och något större ökning i nedströms (MW5). Denna initiala ökning kan antas bero på ökad mobilisering av förorening från den fasta matrisen. Orsak till mobilisering från den fasta matrisen/jorden kan ha varit att

1. injektionens temporärt ökade vätsketryck pressat ut förorening ur matrisen,
2. tillsatt kolkälla ökade lösligheten av förorening i matrisen,
3. ökad bakterieaktivitet ökade produktionen av ytaktiva ämnen som löste ut föroreningen.

Halterna minskade därefter temporärt, varefter en tydlig haltökning erhöles som var mer utdragen i tid. Strax innan bioaugmentationen hade halterna återigen minskat. Den mer utdragna temporära haltökningen kan ha orsakats av den ökade mikrobiella aktiviteten (fermentation och deklorering) som genererades av den tillsatta kolkällan (biostimuleringen). Temporärt ökade halter vid biostimulering har även rapporterats i annat svenskt fälttest (Larsson *et al.*, 2014).

Vid den efterföljande bioaugmentationen tillsattes fermentationsprodukt/fettsyra som kan ha genererat den därefter temporära haltökningen i främst MW3-1. Motsvarande effekt uteblev i MW4, vilket eventuellt kan ha berott på att summahalten av de klorerade etenerna i dess jordmatris med tiden minskat. Halterna i grundvattnet i den punkten var låga strax innan, och efter, bioaugmentationen.

Det är känt att stimulering av bakterietillväxt kan öka bakteriell produktion av ytaktiva ämnen som lösgör förorening från jordmatris ut i akvifären för att mikroorganismerna lättare ska komma åt föroreningen/födan. Dessutom kan bildade fermentationsprodukter/fettsyror ha ökat lösligheten för föroreningen, dvs. bildade fettsyror agerar som ytaktiva ämnen (Karanth *et al.*, 2010; Saharan *et al.*, 2011). I det aktuella fallet har fermenterande mikroorganismer och fermentationsprodukter troligtvis spelat huvudrollen. Produktion av ytaktiva ämnen från kloreten-deklorerande mikroorganismer anges endast sparsamt i litteraturen.



Figur 5.7 Förändring av molbaserade totalhalter av kloreter i testområdets grundvatten. Röd vertikal linje motsvarar tid för biostimulering och blå vertikal linje tid för bioaugmentation, i båda fallen intill MW3-1 resp. MW4 inom försöksområdet. MW5 är provpunkt nedströms, där biostimulering och bioaugmentation inte utförts (data från Branzén och Ländell, 2017).

5.2.6 Stallning

Med stallning (från engelskans "stalling", ungefär "avstannat") menas att den sekventiella mikrobiella dekloreringen av klorerade etener stoppas upp vid främst DCE. En mindre del av detta DCE kan eventuellt dekloreras till VC men därefter är det stopp för vidare deklorering. Detta innebär att man kan få en uppkoncentrering av DCE och VC. Emellertid är sådan uppkoncentrering inte något entydigt bevis på stallning och på att bioaugmentation (med speciella stammar av *Dhc*) är nödvändig för fortsatt deklorering till icke-klorerade föreningar. Det kan finnas andra orsaker, exempelvis att:

1. det finns en källa/hotspot som tillför PCE och/eller TCE till provpunkten men förutsättningarna på platsen är sådana att dessa högklorerade etener dekloreras snabbare än vad bildat DCE och VC dekloreras
2. klorerade etener har olika vattenlöslighet ($PCE < TCE < DCE < VC$) som innebär att lågklorerade etener löses ut i högre halt från akvifärmatrisen än högklorerade etener
3. akvifären kan ha pH som är acceptabelt för mikroorganismer som utför deklorering av högklorerade etener men som ligger under eller över optimalt pH-intervall för mikrobiell deklorering av lågklorerade etener. Detta behöver inte innebära att de speciella stammarna i släktet *Dhc* inte föreligger. De kan finnas i sådan akvifär, men i alltför låga halter som kan öka om man enbart tillför pH-justerande medel. Haltbestämning av *Dhc* och deras deklorerings-specifika gener samt mätning av pH kan ge information om status
4. det kan finnas geokemiska elektronacceptorer som tar upp de elektroner (vanligtvis kopplade till producerat väte) som i annat fall *Dhc* behöver för dekloreringen av lågklorerade etener, varvid det eventuellt kan räcka med biostimulering för att öka produktion av väte (genom fermentationen) och därmed stimulera tillväxten av befintliga *Dhc*
5. reduktiv deklorering av lågklorerade etener (DCE, VC) kan endast utföras av speciella stammar av *Dhc* medan reduktiv deklorering av högklorerade etener (PCE, TCE) kan utföras av ett stort antal olika släkten av mikroorganismer. De senare har då större möjligheter att konkurrera om vätet. Haltreduktionen av PCE och TCE kan behöva bli avsevärd (med uppkoncentrering av t.ex. VC) innan *Dhc* kan utföra dekloreringen.

6. Biokemisk guide för beslut om biostimulering och bioaugmentation

6.1 Inledning

I Avsnitt 6.2 nedan ges ett enkelt flödesschema, som kan vara ett stöd inför beslut att genomföra förstärkt mikrobiell nedbrytning i fullskala. Flödesschemat förutsätter att inledande tester med biostimulering, och vid behov även bioaugmentation, har utförts. Sådana tester utförs med fördel i pilot-/fältskala. I Bilaga 1 ges fördjupad information om bl.a. de mikrobiella analyser som då bör ingå för optimal utvärdering. Generellt sett är fälttest att föredra före laborietester, eftersom fälttest bättre återspeglar de verkliga förhållandena vid en behandling i fullskala.

För att kunna välja ett lämpligt område för pilot-/fälttest så behövs ett bra underlag. Detta omfattar bl.a. kemiska och mikrobiella analyser av akvifären. Testområdet kan delas in i tre mindre delområden där en del utsätts för biostimulering, en andra del för både biostimulering och bioaugmentation och en tredje del utgör ett referensområde som lämnas utan åtgärd. Design innefattar bl.a. bestämning av lämpliga ROI (Radius of Influence/influensradie) så att delområdena påverkar varandra så lite som möjligt. Testet kan då utföras genom direktinjektion intill övervakade grundvattenbrunnar som är placerade i respektive delområde.

Om injektioner inte kan utföras i lämpligt delområde kan ostört prov av jord/akvifärmaterial placeras i lämpliga behållare och utsättas för biostimulering, bioaugmentation eller inget alls på laboriet. Därefter placeras de ut i de punkter/grundvattenrör i akvifären som jorden togs från. Om man efter viss tid finner signifikant produktion av eten i bioaugmentationsdelen men inte i biostimuleringsdelen är bioaugmentation att rekommendera i fullskaledesignen. Testtiden bör vara minst två månader.

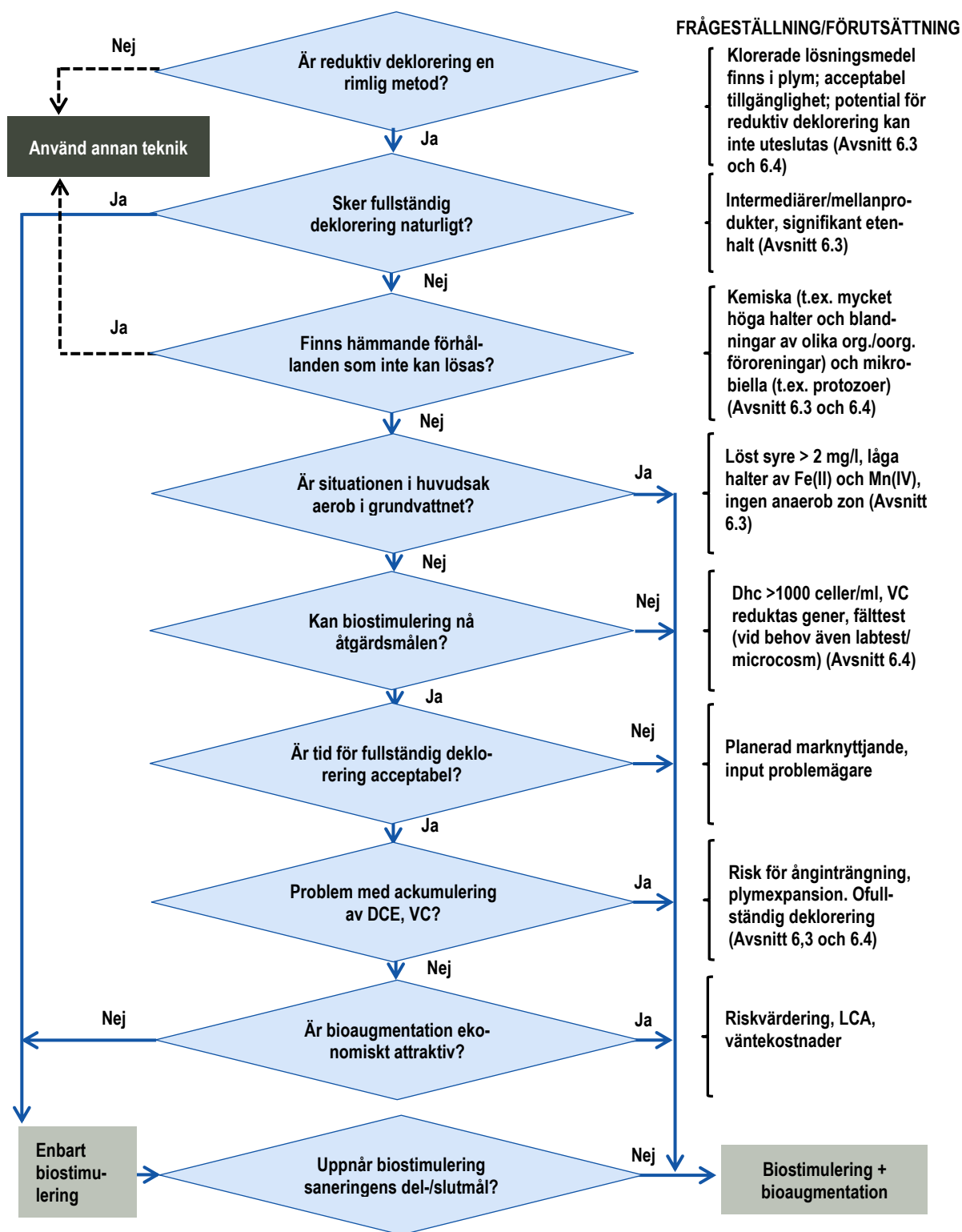
I tredje hand kan tester i fält med passiva avancerade mikrobiella provtagare utföras, men utfallet kan ge tvetydliga resultat (Larsson *et al.*, 2014).

Flödesschemat nedan följs av ett kemiskt och ett biologiskt avsnitt. I dessa avsnitt ges frågor och svar relaterade till parametrar och faktorer som påverkar förutsättningarna för biostimulering och bioaugmentation. Om svaren sammantaget blir ”ja” så bör de kemiska och biologiska förutsättningarna vara mycket goda för att uppnå optimala förhållanden för fullständig nedbrytning av klorerade etener. Frågorna och svaren är baserade på svenska (Branzén och Ländell, 2017) och utländska (Stroo *et al.*, 2013) erfarenheter.

Kemiska och mikrobiella analyser, och relevant utvärdering av dessa, har en central roll för bedömning av behov och resultat av biostimulering – bioaugmentation. Eftersom tid mellan provtagning och mikrobiella genanalyser behöver vara kort kan långa svarstider för analysresultat samt leverans av mikrobiella prover till analyslaboratorium vara begränsade faktorer vid val av åtgärdsalternativ. Behovet av att involvera flera svenska aktörer (t.ex. universitetsbaserade och kommersiellt baserade laboratorium) är därför stort och är en viktig del i etableringen av tekniken i Sverige.

6.2 Flödesschema

I Figur 6.1 ges flödesschema för bedömning av möjlig biostimulering/bioaugmentation. Begränsad information ges i Avsnitt 6.3-Avsnitt 6.4. Mer fullständiga svar ges i övriga kapitel samt i Bilaga 1.



Figur 6.1 Flödesschema för bedömning att genomföra biostimulering och/eller bioaugmentation (modifierad från Stroo *et al.*, 2013).

6.3 Kemiska frågor och svar

I detta avsnitt besvaras ett urval av vanliga kemiskt baserade frågor kopplade till att åtgärda akvifärer förorenade av klorerade lösningsmedel med förstärkt reduktiv deklorering. För mer information hänvisas till övriga kapitel samt till Bilaga 1.

1) *Föreligger hotspot som innehåller fri produkt? Om så är fallet - är mängden fri produkt tillräckligt liten för att den förorenade akvifären kan behandlas inom rimlig tid med förstärkt reduktiv deklorering?*

För att avgöra hur mycket fri produkt som kan finnas så krävs vanligtvis en omfattande och kostsam strategi för sådan undersökning.

UK Environment Agency (2003) beskriver en tumregel som kan användas för att bedöma potential för närvaro av fri produktfas. Potential för fri produkt av klorerat lösningsmedel (t.ex. TCE) i direkt kontakt med grundvattnet, föreligger om man i grundvattenrör, placerat strax nedströms eventuell fri produktfas, uppmäter en halt av detta lösningsmedel som är minst 1 % av det klorerade lösningsmedlets effektiva löslighet. Även om värdet signifikant understiger 1 % så kan potential för fri fas ändå inte uteslutas, men sannolikheten för fri fas i närliggande område strax uppströms provpunkten är då liten. Tumregeln ger ingen information om storleken på denna fria fas, dvs. om den är begränsad till mindre volym i någon/några små ganglia eller om den är i form av signifikant pool av fri produktfas.

Om indikation på fri produkt erhålls så behöver volymen fri produkt bestämmas innan man tar beslut om lämplig åtgärds metod. Om volymen bedöms vara så stor att annan metod än stimulerad reduktiv deklorering är bäst lämpad för sådan hotspot så bör man ändå överväga att välja metod för hotspot som kan samspela med reduktiv deklorering av pplymen.

Datorprogram för beräkning av mängd substrat för biostimulering ges i Bilaga 1, avsnitt 3.3.3. Information om ett flertal beräkningssätt och datorprogram för analytisk modellering/beräkning av saneringstid kan fås i bilagan ”Verktyg för potential och prognos” i Larsson (2009). De gäller för naturlig självrening av klorerade lösningsmedel men kan i de flesta fall även användas för bedömning av saneringstider för förstärkt naturlig självrening.

2) *Är pH alltför lågt eller för högt?*

Enligt US EPA (2015) ska pH ligga inom intervallet 5 - 9 för att signifikant reduktiv deklorering ska kunna upprätthållas. Ett pH utanför detta intervall indikerar att en buffertlösning behöver tillsättas. Mikroorganismer som deklorerar högklorerade etener klarar vanligtvis pH ned i den lägre delen av detta intervall men för deklorering av lågklorerade etener krävs ett snävare intervall kring neutralt pH. Optimalt för *Dhc* är pH 6,5 - 8,0.

3) *Är temperaturen en inhiberande faktor?*

I litteraturen anges att fullständig deklorering har skett i intervallet 4 - 40 °C. Vilken biostimulerande kolkälla som tillsatts verkar ha viss betydelse. I test fann man platsspecifikt att fullständig deklorering av TCE-förorenat vatten erhöles ned till ca 10 °C med tillsats av laktat men endast ned till 15 °C med propionat. Vid 4 °C erhöles en fullständig stallning vid *cis*-DCE med laktat som kolkälla medan redan vid, eller strax under, 10 °C erhöles stallning med tillsats av propionat. Ingen deklorering erhöles vid 40 °C med någon av dessa kolkällor (Friis *et al.*, 2007).

Lämpligt temperaturintervall, och var dess gränser går plats specifikt, kan eventuellt även bero på vad tillsatta mikroorganismer är vana vid. Exempelvis fann man god förmåga att bryta ned petroleum hos bakterier som naturligt fanns i 5 °C grundvatten i Alaska (Atlas och Schofield, 1975). Det finns t.o.m. bakterier som är metaboliskt aktiva vid temperaturer under 0 °C i permafrostområden (Jansson och Tas, 2014).

4) *Är redox tillräckligt lågt för fullständig deklorering?*

De *Dhc* som har förmåga att reduktivt deklorera lågklorerade etener kräver att redox är <-300 mV till <-400 mV (SHE) för utmärkt/bra reduktiv deklorering av VC, Tabell 4.1 (dock, även om redox är lågt, så är tillgången på väte mer kritiskt). Man bör tänka på att om redox sänks, samtidigt som marken innehåller signifikanta halter arsenik i marken, kan arseniken mobiliseras (genom att As(V) då kan överföras till mer mobilt As(III)). Om det samtidigt bildas sulfider kan sulfidkomplex av As bildas som i viss mån kan motverka transportbenägenheten hos As(III) (Mueller och Booth, 2016).

5) *Är fältmässig mätning av redox tillförlitligt?*

Enbart fältmätning av redox kan ge osäkra utfall och bör kompletteras med kemisk analys. Frågan man bör ställa efter sådan kemisk analys är om det föreligger alltför höga halter av geokemiska elektronacceptorer, t.ex. av Fe³⁺, Mn⁴⁺, SO₄²⁻, för deklorering av olika klorerade etener.

Geokemiska elektronacceptorer konkurrerar om att förbruka det väte som de mikrobiella deklorerarna behöver. Deklorering av PCE kan ske vid så högt redox som motsvarar nitratreduktion men ju lägre redox desto snabbare går reduktionen av PCE. Principiellt gäller ju mindre klor på den klorerade molekylerna desto lägre redox krävs för dess deklorering.

Deklorering av VC kräver i princip redox som motsvarar metanproduktion men kan i vissa fall ske även under sulfatreducerande förhållanden. Men även om redox är relativt lågt kan höga halter av kvarvarande enskilda geokemiska elektronacceptorer motverka deklorering. Exempelvis, om redox motsvarar nivåer för sulfatreduktion så kan sulfathalter över 1000 mg/l generera höga halter av mikrobiella sulfatreducerare som konsumerar väte. Däremot anses halter av sulfat under 500 mg/l inte utgöra några problem.

6) *Finns okända elektronacceptorer/vätekonsumenter i grundvattnet?*

Effekt av okända konkurrerande vätekonsumenter indikeras via mätning av halt löst väte i grundvattnet. Om det är tydligt att fermentation pågår men halterna av väte ändå är låga (≤ 0,1 nanomol/liter) bör konkurrensen om vätet betraktas som stor (information om nödvändiga vätehalter ges i Bilaga 1). Om oklarheter föreligger och om det är möjligt, överväg analys av halt löst väte i vattnet. Se även punkt 15.

7) *Föreligger alltför höga halter av löslig sulfid (t.ex. i form av löst svavelväte)?*

Sulfid kan vara skadligt för deklorerare men halten bör i så fall vara hög-mycket hög; dock har man inte fastslagit vad höga halter motsvarar siffermässigt. Höga lösliga sulfidhalter kan fällas ut med tillsats av järn.

8) *Föreligger höga metanhalter?*

Alltför höga metanhalter kan indikera avsevärd konsumtion av väte av metanproducerande mikroorganismer, som i sin tur kan hämma den mikrobiella dekloreringen (Bilaga 1). Därtill kan höga metanhalter utgöra explosionsrisk (Kapitel 7).

9) *Finns andra ämnen/föreningar som kan hämma/inhibera de deklorerande mikroorganismerna?*

Trikloretan och kloroform kan hämma enzymen hos de mikroorganismer som deklorerar klorerade etener. Det är oklart vid vilka halter som sådan hämning blir signifikant. Om man misstänker problem med någon av dessa kloreteraner, testa då att bioaugmentera med bakterier som deklorerar dem. Exempelvis så finns det idag kommersiellt tillgängliga bakterier specialiserade att deklorera TCA. Andra hämmande föreningar är t.ex. freoner, biocider och mycket höga halter av biologiskt hämmande tungmetaller.

10) *Om redox är lågt eller mycket lågt: Bildas önskvärda icke-klorerade nedbrytningsprodukter i någon signifikant utsträckning, för klorerade etener t.ex. eten? Ökar dekloreringsgraden tillfredställande över tid?*

Etenhalterna bör ligga över 200 µg/l för indikation på fullständig deklorering. Dekloreringsgrader (DKG) signifikant över 67 % eller 75 % då TCE respektive PCE är ursprungsförening, indikerar att fullständig deklorering pågår men över tid behöver dekloreringsgraden bli 100 %.

11) *Betydande halter av VC och DCE, borde teoretiskt (baserat på redox, höga halter av speciella gener, andra parametrar etc.) finnas lokalt i akvifären, t.ex. i plymens nedre del, men de saknas, varför?*

Om det av någon anledning föreligger måttligt – högt redox (t.ex. orsakat av lokalt inströmmande vatten med måttligt – högt redox) lokalt i plymen så kan det bero på att det lokalt sker oxidation av lågklorerade etener med slutligt bildande av bl.a. CO₂. Om denna oxidation sker i nedre delen av plymen kan det minska risken att potentiella receptorer nedströms denna del av plymen förorenas av VC.

12) *Är föroreningshalterna lokalt alltför höga så att de kan inhibera mikroorganismerna?*

Enligt Stroo *et al.* (2013), som refererar till andra, har halter över halva lösligheten i något fall visat sig vara alltför höga/inhiberande (t.ex. PCE över 90 mg/l, Amos *et al.*, 2007) för reduktiv deklorering. I andra fall har PCE-halter upp till nära dess maximala effektiva löslighet accepterats mikrobiellt resulterande i signifikant deklorering (Carr *et al.*, 2000).

13) *Är föroreningshalterna alltför låga för att upprätthålla tillräcklig halt av Dhc och av gener specifika för deklorering av kloreteraner?*

Om summahalter av de klorerade kolvätena är under 50 µg/l, men inte tillräckligt låga för att motsvara uppställda saneringsmål, kan bioaugmentation (eventuellt tillsammans med biostimulering) behövas. De speciella Dhc som deklorerar lågklorerade etener, nyttjar dessa etener som föda (metabol deklorering). Alltför låga halter av sådana etener kan resultera i att halten av Dhc sjunker så lågt att de sammantaget inte har motstånd mot att bli utmanövrerade av övriga närvarande mikroorganismer. Bioaugmentation med Dhc kan då återställa, om än tillfälligt, den mikrobiella status som krävs för önskad deklorering.

14) *Är halten fermenterbar kolkälla tillräckligt hög?*

För att vara säker på att det organiska innehållet i akvifären stödjer reduktiv deklorering bör fermenterbart TOC/DOC överstiga 20 mg/l (US EPA, 2015). NAVFAC (2011) anger att halter över 10 mg/l av fermenterbart organiskt innehåll i vatten kan vara tillräckligt, förutsatt att redox är

<-100 mV (SHE). För att stödja signifikant deklorering bör dock halten fermenterbart enligt US EPA (2015) vara 20-50 mg/l (och redox <-200 mV SHE; dock för utmärkt/bra fullständig deklorering, dvs. deklorering av VC, bör redox vara <-300 mV SHE till <-400 mV SHE, Tabell 4.1).

Halterna av fermenterbar kolkälla/substrat bör endast ses som en grov vägledning. Effekten av olika halter av substrat är starkt beroende av vilket substrat/kolkälla som används samt bl.a. hur väl kolkällan kan spridas i akvifären på den aktuella platsen. Baserat på numeriska beräkningar fann Mohsen *et al.* (2016) att den stödjande effekten av substrat (acetat) som elektrondonator-källa för mikrobiell reduktiv deklorering avtog signifikant inom ett relativt smalt koncentrationsspann av substratet. Effekten berodde också på den platsspecifika Monod-koefficienten för substratet (olika platsspecifika organismer kan nyttja substratet olika effektivt och med olika hastigheter). I deras fall var den stödjande effekten endast 50 % av optimalt då halten substrat var 100 mg/l, medan denna halt av substratet nästan inte gav någon stödjande effekt alls då värdet på koefficienten ökades med en tiopotens.

15) Är fermentationen alltför låg?

Omfattning av fermentationen kan fås genom kvantitativ analys av flyktiga fettsyror (VFA). Summan av de vanligaste VFA (se Bilaga 1) bör överstiga 50 mg/l. Halter därunder bör direkt resultera i ny omgång av biostimulering. Målsättningen med fermentationen är att producera väte så att optimal vätehalt upprätthålls. Ett direkt mått på hur väl fermentationen går kan fås genom att analysera löst väte i grundvattnet. Halten bör ligga i intervallet 2-11 nanomol/l. I Bilaga 1 beskrivs hur prov för sådan analys ska tas och hur sådan analys kan utföras. Dessutom redovisas vilka halter av löst väte som krävs för varje enskilt dekloreringssteg.

6.4 Mikrobiella frågor och svar

I detta avsnitt besvaras ett urval av vanliga mikrobiellt baserade frågor kopplade till att åtgärda akvifärer förorenade av klorerade lösningsmedel med förstärkt/påskyndad reduktiv deklorering. För mer information hänvisas till övriga kapitel samt till Bilaga 1.

1) Är detekterade halter av *Dhc*, samt av generna *vcrA* och/eller *bvcA*, tillräckliga för fullständig deklorering?

Om *Dhc* föreligger med $>10^3$ celler/ml grundvatten, samtidigt som eten detekteras med signifikanta halter ($>200 \mu\text{g/l}$); alternativt i bästa fall en halt av eten över ca 10 % av ursprunglig totalhalt av klorerade etener), så är bioaugmentation troligtvis inte nödvändig.

För att säkerställa att saneringen resulterar i tillräckligt omfattande fullständig deklorering bör dock kravet $\geq 10^4$ celler *Dhc*/ml grundvatten kontinuerligt uppfyllas, tillsammans med krav på att minst en av generna *vcrA* och *bvcA* föreligger med minst 10^4 genkopior/ml (Tabell 5.1 och Tabell 5.2). I annat fall bör man, över tid, utföra en eller flera bioaugmentationer med *Dhc*, vid behov i samspel med biostimulering.

Observera, frånvaro av *vcrA* eller *bvcA* är inget 100 % säkert bevis på frånvaro av genetisk potential (detekterad i DNA) eller reell aktivitet (detekterad i RNA) för fullständig reduktiv deklorering av klorerade etener. Dessa två gensekvenser är de idag de hittills enda kända som både kan kopplas till deklorering av DCE och VC och de enda där kommersiella laboratorier erbjuder analys.

Om kort saneringstid är en viktig faktor (<5 år tills åtgärds mål ska nås), samtidigt som *Dhc* föreligger med $<10^2$ celler/ml grundvatten, så bör bioaugmentation utföras så fort lämpliga förhållanden

föreligger (pH 5,5-8,0 för högklorerade etener och pH 6,0-8,0 för deklorering av DCE och VC; ORP <-200 mV (SHE) för högklorerade etener och <-300 mV (SHE), helst <-400 mV (SHE), för lågklorerade etener, Tabell 4.1, samt signifikant fermentation som platsspecifikt kan upprätthålla 2-11 nanomol väte/l för deklorering av VC, se Bilaga 1, etc.). Dessa förhållanden föreligger sällan samtidigt naturligt och kan därför först behöva skapas via biostimulering, tillsats av buffert etc., varefter bioaugmentation utförs. För att förkorta saneringstiden kan man överväga att utföra allt samtidigt.

Om *Dhc* föreligger med <10² celler/ml grundvatten, samtidigt som en saneringstid på 5-10 år kan accepteras, kan man utföra biostimulering med efterföljande provtagningar där halt *Dhc*, klorerade kolväten, eten/etan, redox, metan etc., analyseras regelbundet (förslagsvis varje 1-2 månad). Om halten *Dhc* och lämpliga gener inte tydligt ökar till 10³-10⁴ celler/ml inom 6 månader efter biostimuleringen, samtidigt som inga tydliga tecken vad avser ökad deklorering erhålls (dvs. ökade halter av dekloreringsprodukter) så bör bioaugmentation utföras inom 12-18 månader efter biostimuleringen.

Om biostimulering pågått i ca 12 månader under fysikaliska/kemiska förhållanden lämpliga för fullständig deklorering (pH 6,0-8,0; ORP/SHE <-300 mV; etc.) men ingen tydlig indikation på fullständig deklorering noteras (fortsatt höga halter av DCE och/eller VC och låg eller ingen produktion av eten/etan) samt att halten *Dhc* kvarstår med <10³ celler/ml grundvatten så bör bioaugmentation utföras.

Här förutsätts att det har klargjorts att den uteblivna fullständiga dekloreringen inte är orsakad av kemisk inhibering (av sulfider och/eller vissa klorerade föreningar) eller mikrobiell inhibering (predatorer, t.ex. protozoer, som håller nere *Dhc* i alltför låga halter, se Bilaga 1). Det förra kan undersökas med kemisk analys medan det senare kan undersökas mikrobiellt, t.ex. genom PLFA analys (phospholipid fatty acids/phospholipid-derived fatty acids).

I Tabell 6.1 ges, utöver ovan, kompletterande förslag på några undersökningar för att utröna behov av bioaugmentation, samt deras för- och nackdelar och tolkningar. De tre översta undersökningarna är vanligast. Om utfallet från dessa inte ger entydiga resultat bör man komplettera med någon/några av de övriga.

6.5 Övrigt kemiskt-biologiskt

Följande mer generella råd kan ses som ett komplement till ovan vid genomförandet av mikrobiell nedbrytning av klorerade etener.

- Om ett stort antal provpunkter/grundvattenrör finns i förorenat område, gör ett strategiskt urval av dessa för kombinerade analyser. Det kan innefatta analyser i varje provpunkt av
 - 1/ aktuella klorerade ursprungsförening/-ar och alla deras möjliga mikrobiellt producerade produkter,
 - 2/ mikroorganismer som kan utföra önskade nedbrytningar samt
 - 3/ motsvarande gener kända att koda för produktion av enzym som utför dessa reaktioner. Om det förorenade området har ett fåtal grundvattenrör bör alla provtas och undersökas.

Val av mikrobiell provtagningsmetod (vattenprov, Bio-Trap[®]/BacTRAP, Jord Mesocosm) beror på kostnader samt respektive metods lämplighet. Vattenprov är billigast och ger snabbast respons på vissa snabba mikrobiella förändringar i akvifären, framför allt vad gäller *Dhc* och

deras gener. Om de mikrobiella förändringarna och motsvarande nedbrytningar av förorening, är långsamma, eller om undersökningen gäller mikroorganismer med förmåga att enbart bryta ned högklorade etener, bör man överväga att inkludera även andra provtagningsmetoder (Avsnitt 5.2.1).

- Analysera flyktiga fettsyror (VFA) för att säkerställa att fermentationen kommit igång. Mät samtidigt specifik elektrisk konduktivitet och ta fram relation baserat på flera parallella mät- och provtagningskampanjer. Om matematiskt förhållande föreligger kan en del av de planerade VFA-analyserna ersättas av fältmätningar av elektrisk konduktivitet.

Tabell 6.1 Undersökningar som kan utgöra underlag inför beslut om fullskaleutförande av bioaugmentation (underlag från Stroo *et al.*, 2013).

Analyser	Fördelar	Nackdelar	Tolkningar
Dhc 16S rRNA 1/	Ger specifik respons på <i>Dhc</i> . Snabb analys. Relativt låg kostnad.	En del <i>Dhc</i> kan inte utföra fullständig deklorering. <i>Dhc</i> analys bör därför kompletteras med gener för produktion av VC reduktas enzym.	Om halten <i>Dhc</i> är $>10^6$ celler/l: Litet behov av bioaugmentation.
VC reduktas gener, (t.ex. <i>tceA</i>, <i>vcrA</i>, <i>bvcA</i>)	Ger specifik respons på potentiell (DNA-analys), eller reell (RNA-analys), förmåga att producera enzymer som deklorerar t.ex. VC. Snabb analys. Relativt låg kostnad.	Inte alla VC reduktiva dehalogenas gener ("RDases") har identifierats.	Om halten <i>vcrA</i> eller <i>bvcA</i> är $>10^5$ gener/l: Litet behov av bioaugmentation.
Eten/etan	Bevis på fullständig deklorering.	Kan oxideras, ger då alltför låg indikation på reduktion.	Om $>10\%$ av ursprunglig totalhalt av klorerade alifater (VOC): Litet behov av bioaugmentation.
Förenings-specifik isotop-analys (CSIA)	Kan ge direkt bevis på att biologisk nedbrytning sker.	Inget svenskt laboratorium (2015). Antal europeiska kommersiella laboratorier som utför CSIA analys för bionedbrytning av klorerade lösningsmedel är starkt begränsat.	Förhållandet normal isotop/tung isotop (t.ex. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) för VC ger direkt information om dess mikrobiella nedbrytning. Därtill kan nedbrytningshastighet beräknas.
Mikrocism (laboratorieskala) 2/	Kan ge bevis, för eller emot, behovet av att utföra bioaugmentation i fält.	Kräver extra kostnad och tid (6-12 mån). Kräver opåverkat platsspecifikt akvifär material.	Tydlig etenproduktion inom 12 månader: Litet behov av bioaugmentation. Avsaknad av eten och <i>Dhc</i> $<10^5$ celler/l: Tydligt behov av bioaugmentation.
In situ mikrocism (fältskala) 3/	Kan ge starkt bevis, för eller emot, behovet av att utföra bioaugmentation i fält.	Kräver extra kostnad och tid (6-12 mån). Provpunkt kan inneha eller avspegla icke-platsspecifika förhållanden.	Etenproduktion inom 2 månader: Litet behov av bioaugmentation. Avsaknad av eten och <i>Dhc</i> $<10^5$ celler/l: Tydligt behov av bioaugmentation.

1/ rRNA är förkortning för "ribosomal ribonucleic acid".

2/ Etablerad laboratoriemetod, bioaugmentation och/eller biostimulering utförs med platsspecifikt akvifärvatten enligt standard (ESTCP, 2003).

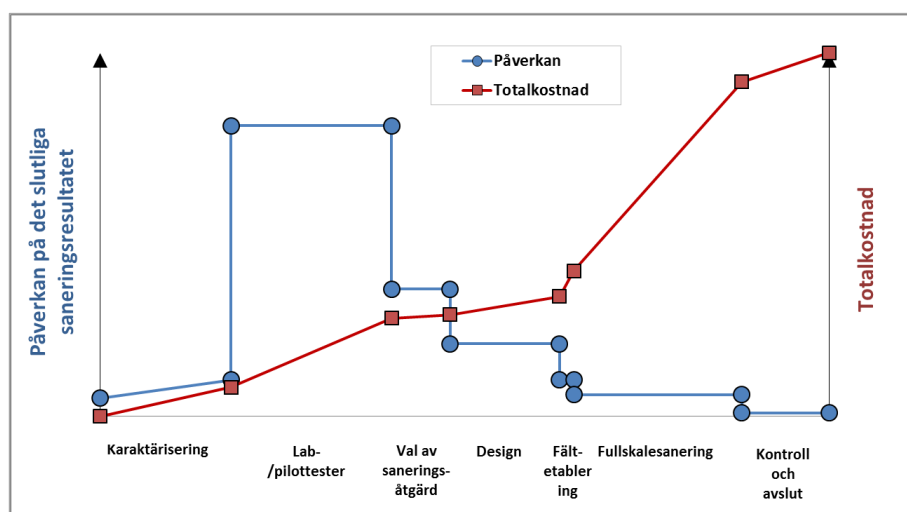
3/ Standardiserad fältmetod (ESTCP, 2003).

7. Rekommendationer och slutsatser

I detta kapitel ges några generella rekommendationer om mikrobiell nedbrytning av klorerade lösningsmedel, framför allt av klorerade etener. Kapitlet avslutas med några slutsatser.

7.1 Lab-/pilot-/fälttesters påverkan på resultat i fullskala

En grundläggande rekommendation är att utföra både lab- och pilot-/fältförsök innan sanering i fullskala påbörjas. Resultat från testerna ger viktiga underlag för att kunna bedöma om förstärkt reduktiv deklorering är lämplig som metod på den aktuella platsen. Erfarenheterna från testerna har stor påverkan på vall av, metod men kan även ge information om möjligt slutligt utfall, både resultat- och kostnadsmissigt. I Figur 7.1 ges en principiell skiss över lab-/pilot-/fälttesters betydelse för det slutliga saneringsresultatet. Om den testade metoden visar sig vara lämplig kan resultaten ha avgörande betydelse för hur sanering i fullskala designas och optimeras. Detta stegvisa förfarande sparar tid och gör den fullskaliga *in-situ* saneringen mer kostnadseffektiv i det långa loppet.



Figur 7.1 Principiell skiss av möjlig påverkan på den slutliga totala saneringskostnaden.

7.2 Saneringstid med biostimulering och bioaugmentation

Saneringar utförda utomlands med förstärkt mikrobiell efterbehandling av klorerade lösningsmedelsförorenade akvifärer, har ofta innefattat kombinationer av biostimulering och bioaugmentation. Fram till 2010 hade ett hundratal områden i USA sanerats med sådana kombinationer (Lyon och Vogel, 2013). Det första lyckade skandinaviska fälttestet av sådan kombination utfördes i Danmark för sanering av grundvatten förorenat av klorerade etener (Scheutz *et al.*, 2008). Före 2011 hade kombinationen utförts i fullskala med lyckade resultat vid ett tiotal områden i både Nederländerna och Danmark (van Bommel *et al.*, 2001). Den vanligaste orsaken till sådant val är att kombinationen har visat sig ha stor potential att minska den totala saneringstiden. Därtill kan en bidragande orsak vara att den extra kostnad som bioaugmentation innebär är liten, jämfört med dess potential att både för korta saneringstiden och totalkostnaden.

I akvifärer förorenade med klorerade etener finns vanligtvis mikroorganismer som kan deklorera högklorerade etener. Tillväxten hos dessa mikroorganismer kan öka genom biostimulering. Men ofta finns inte de speciella stammarna av *Dhc* i tillräckligt höga halter. Ibland saknas de helt. Om dessa *Dhc* inte förekommer naturligt så är bioaugmentation nödvändig för att fullständig deklorering ska kunna nås. I annat fall sker stalling vilket kan resultera i ökade koncentrationer av cancerogent VC och vanligtvis även av DCE. Detta är ett scenario som man vill undvika. Om dessa *Dhc* förekommer, men med alltför låga halter, kan bioaugmentation med speciella stammar av *Dhc* påskynda saneringen. Detta sker genom att tillsatsen minskar den tid som mikroorganismerna i akvifären behöver för att etablera sig, växa till och nå kritisk massa/halter för fullständig deklorering.

Att snabba på saneringen genom att utföra både biostimulering och bioaugmentation kan alltså vara fördelaktigt både för det enskilda projektet och för samhället i stort. Bioaugmentation kan utföras i samband med biostimuleringen. Kombinationen har fördelen att marken relativt snabbt kan användas. Om enbart biostimulering utförs kan utökade kontrollprovtagningar och analyser behöva utföras under själva saneringen, t.ex. varje kvartal i upp till 12 - 18 månader efter biostimuleringen för att klargöra eventuellt behov av efterföljande bioaugmentation. För att kunna bedöma akvifärens potential att deklorera lågklorerade etener, bör man redan inför biostimuleringen ha detekterat närvaro (dvs. halter över detektionsgräns) av både *Dhc* och gener som kan kopplas till deklorering av lågklorerade etener.

Potentialen för att enbart biostimulering skulle kunna vara tillräcklig bedöms utifrån detekterade halter av *Dhc*, tillsammans med övrig mikrobiell och genmässig status samt med akvifärparametrar som redox (helst via geokemisk elektronacceptor status). Andra faktorer att beakta är pH, TOC/DOC, temperatur, status och förändringar i DKG, etc. Bedömningen bör även ta hänsyn till att det sannolikt kommer att ta relativt lång tid innan deklorering av lågklorerade etener kommer igång. Orsaken är att det kan ta betydande tid att med enbart biostimulering få fåtalet *Dhc* med rätt gener, att uppnå en tillväxt som resulterar i halter över vad som krävs för fullständiga reduktion (se Tabell 5.1 och Tabell 5.2).

7.3 Val av substrat

Olika substrat/kolkällor fermenteras olika snabbt. Därför kan val av substrat påverka saneringstiden. Oljiga produkter (t.ex. sojabönsolja) tar betydligt längre tid att fermenteras fullständigt, jämfört med sockerprodukter (t.ex. melass) eller flyktiga fettsyror, VFA (t.ex. mjölksyra/laktat). Fermentation kan orsaka problem genom att den kan understödja produktion av metan. Förutom att metanproduktion kan innebära konkurrens om vätet (till den reductiva processen) så kan metangas utgöra explosionsrisk. Framför allt snabbfermenterade substrat kan snabbt bilda höga halter av metangas. Eftersom man vill undvika alltför hög produktion av metan kan feta substrat injekteras i större mängder och vid färre tillfällen än mer snabbfermenterade substrat. Dock kan höga metanhalter även bildas av oljiga produkter men denna metanproduktion tar betydligt längre tid på sig. De högsta metanhalterna kan uppkomma mindre än ett år efter injektion med snabba substrat, medan det kan ta mellan ett till fem år efter injektion med långsamma substrat. Därtill, alltför stor andel långsamt fermenterande produkter kan ge alltför låg fermentation, som resulterar i alltför låga vätehalter.

En del kommersiellt tillgängliga substrat innehåller både snabba och mer långsamt fermenterande substanser. Avsikten är att få en inledande snabb, med en efterföljande mer långsam, fermentation. Därtill innehåller dessa produkter ibland även detergent, dvs. ytaktiva ämnen, som gör att den oljiga produkten delas upp i små aggregat av fettdroppar med polära/vattenlösliga ytor. Detergenterna underlättar fördelning av oljeprodukten ut i grundvattnet vilket i sin tur kan påskynda fermentationen.

En annan viktig faktor att ta hänsyn till är klogkning. Ju mer av en kolkälla man tillför desto större potential för kraftig bakterietillväxt och desto större problem kan uppkomma med igentäppning av injektionsrör, kontrollrör och/eller markens porer. Ju mer igenkloggade injektionsrören och/eller deras närområden blir, desto svårare blir det att sprida ut injektionsvätskan.

Det finns gratis tillgängliga, excelbaserade, beräkningsprogram från US EPA som kan användas för att välja kolkälla och bedöma vilka mängder som behövs. Även kostnaden kan uppskattas genom dessa program, se vidare Bilaga 1 (SERDP/ESTCP, 2015; SERDP/ESTCP, 2013).

7.4 Mobilitet och spridning

Om enbart biostimulering utförs så kan det innebära vissa risker. Det vanligaste är stallning, dvs. att dekloreringen avstannar med uppkoncentrering av toxiska produkter, speciellt VC. Detta kan i sin tur resultera i att föroreningsplymens nedre del får ökade halter av VC.

En annan risk med enbart biostimulering är ökad frisättning av förorening från akvifärens fasta matris ut i grundvattnet. Frisättningen kan i sin tur öka plymens utbredning vilket kan ge negativ påverkan på nedströms recipienter. Detta kan även öka halterna av klorerade lösningsmedel och nedbrytningsprodukter i porgas och luft (ITRC, 2005). Det är i huvudsak inte tillförseln av biostimulerande vätska som genererar plymökningen och ökad potentiell gasavgång. Det är istället fermentationen av injekterad kolkälla som är huvudorsak. Vid fermentation av tillsatta substrat bildas bl.a. fettsyror. Dessa fettsyror kan agera som ytaktiva ämnen och då orsaka att de klorerade kolväten som sitter bundna i akvifärmatrisen/jorden får en ökad löslighet och därmed lättare löser sig i, och transporteras med, grundvattnet. Exempelvis kan 25%-ig mjölksyra och/eller 25%-ig ättiksyra fyrfaldigt öka lösligheten av TCE (ITRC, 2008b).

Vissa bakterier kan själva producera art- och föroreningspecifika bioaktiva ämnen, i avsikt att lättare komma åt och transportera förorening (i deras fall ”föda”) in i sina celler. Mikrobiell produktion av bioaktiva ämnen är relativt vanligt förekommande i en förorenad akvifär men det är oklart hur väl dessa ämnen kan lösa ut klorerade etener från fasta matriser.

En viktig fördel med att koppla bioaugmentation till biostimulering är att deklorering av VC startar eller påskyndas. En annan fördel är att ovan nämnda massökning av klorerade föreningar i grundvattnet, med risk för ökade halter, plymutbredning och gasavgång, kan begränsas. Orsaken är att de mikroorganismer som tillsätts via bioaugmentationen totalt sett ökar nedbrytningen av den från matrisen frigjorda föroreningen.

7.5 Kontroll av metan och svavelväte

Metan bildas via metanogenesis och dess ursprungsföreningar är antingen små organiska molekyler (främst ättiksyra) eller koldioxid och väte (se Bilaga 1 om fermentation). Vid biostimulering sker vanligtvis en ökning av metanproduktionen. Det beror på att tillsatt kolkälla fermenteras till små organiska molekyler och väte som via metanogenesis bildar metan.

Det är viktigt att kontrollera halterna av gasformigt och löst metan, framför allt efter biostimulering. Biostimulering med fermenterbar ”snabb” kolkälla som melass, laktat etc. kan redan efter några månader generera explosiva halter (se nedan) av metan. För ”långsamma” kolkällor (sojabönsolja, majsolja, jordnötsolja etc.) är tidshorisonten istället ett par år. Därför bör man alltid kontrollera halten metangas i omättad zon och löst metan i grundvattnet.

Flera delstater i USA har riktvärden för metan i vatten på 7 - 10 mg/l som en nivå då åtgärder måste vidtas för att minska halterna (Ohio, 2012; Molofsky *et al.*, 2013; Mueller och Booth, 2016). Det finns idag kommersiella produkter som kan tillsättas till jord, sediment och grundvatten för att minska problemet med metan (Mueller *et al.*, 2014).

Metans maximala löslighet i vatten ökar med minskad temperatur. Vid 1 atm är maximala lösligheten ca 23 mg/l vid 20 °C, ca 30 mg/l vid 12 °C, ca 34 mg/l vid 7 °C och ca 39 mg/l vid 0 °C (ETB, 2015). Gasformig metan kan bildas fastän vattnet inte är mättat, men ju närmare mättnadsgraden desto större andel avgår i gasfas. Gas bestående av 100 % metan är inte explosivt. Metan måste blanda sig med luftens syre i vissa begränsade proportioner för att bli explosivt. Halter av metan i luft som ligger inom intervallet 5-15 vol-% vid 20 °C och 1 atm är alltså explosiva om blandningen kommer i kontakt med tändningskälla. Om metanhalter i luft/atmosfären överstiger 1 vol % (10 000 ppm) så är rekommendationen därför att området ska evakueras och ventileras med frisk luft (Eltschlager *et al.*, 2001).

Biostimulering i akvifär, som genererar redox inom intervall för sulfatreduktion, kan orsaka produktion av svavelväte (H₂S). Detta sker då akvifären innehåller signifikanta mängder sulfat som då kan reduceras till sulfid/svavelväte. Även mycket låga halter svavelväte i luft (1000-2000 ppm) kan vara dödliga om de inandas (CDC, 2015) och därtill ligger explosiva halter (LEL och UEL) inom intervallet 4-44 vol-% (MGP, 2015). Vidare, betydande halter sulfat konkurrerar negativt med den mikrobiella reduktiva dekloreringen vad gäller det väte som bildas vid fermentationen. Lämpliga förhållanden för reduktiv deklorering föreligger då sulfathalten är under 500 mg/l och ju lägre halt desto bättre.

7.6 Slutsatser

Design och utvärdering av kemiska och mikrobiella tester, som utförs dels inför val av förstärkt självrening av klorerade lösningsmedel, dels under och dels efter fullskaleutförandet, kräver god mikrobiell och kemisk kunskap. Förhoppningen är att föreliggande publikation bidrar till detta samt att bioaugmentation, i kombination med biostimulering, kommer att beaktas i större utsträckning än idag vid svenska efterbehandlingar av lösningsmedelsförorenade akvifärer.

Det är långt ifrån alltid som de platsspecifika förhållandena möjliggör att enbart biostimulering kan ge acceptabel halt- och massreduktion inom acceptabel tid i akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel. Därför bör potentialen för kombinationen biostimulering – bioaugmentation bör klarläggas redan initialt inför optimalt val av åtgärd.

Alternativt, framför allt vid större saneringar, bör man överväga att redan i inledningen av fullskalan utföra kombinationen, utan någon föregående undersökning avseende effekt av kombinationen. Merkostnaden för fullskalekombinationen kan bli relativt låg, samtidigt som man blir mer säker på att saneringsförloppet kommer igång omedelbart, inklusive deklorering av de lågklorerade etenerna (dikloretener/DCE och vinylklorid/VC). Dessutom undviker man att biostimulering i efterhand visar sig vara otillräcklig och att man ändå måste tillsätta bakterier i slutänden (bioaugmentation), vilket kan förlänga den totala saneringstiden.

Slutligen, vid riskbedömningar bör större hänsyn tas till att icke deklorerat VC, och i viss mån DCE, har potential att genomgå mikrobiell oxidation/mineralisering, framförallt i nedersta delen av plym fastän redox där tidigare ansetts vara alltför lågt för sådana reaktioner.

8. Ordlista

Ord	Förklaring
Abiotisk	Icke-biologisk, t.ex. kemisk.
Bioaugmentation	Metoder som med hjälp av biologiska tillsatser, t.ex. bakterier, påskyndar/förstärker den biologiska nedbrytningen av t.ex. en förorening.
Biotisk	Biologisk
Biostimulering	Metoder som med hjälp av aktiviteter och kemiska tillsatser, t.ex. melass, påskyndar den biologiska nedbrytningen av t.ex. en förorening.
Cometabol process	Process/reaktion i cellens enzym som inte resulterar i någon nytta/energivinst/celluppbyggnad för cellen. Reaktionen sker alltid samtidigt med, men ändå mer sällan – mycket mer sällan än, metabola reaktioner,
Deklorering	Kemiska och biologiska processer där klororganiska föreningar (t.ex. TCE) blir av med minst en kloratom i sina molekyler. Information om kemisk deklorerings, se Avsnitt 4.4.2.
DNAPL	Dense Non-Aqueous Phase Liquid (vätska som är tyngre än vatten och har låg löslighet i vatten).
Elektronacceptor	Grundämne eller förening som under reaktion med annat ämne/förening tar emot en eller flera elektroner. I samma reaktion måste det finnas annat ämne/förening som lämnar ifrån sig denna/dessa elektroner (s.k. elektrondonator).
Elektrondonator	Grundämne eller förening som under reaktion med annat ämne/förening lämnar ifrån sig en eller flera elektroner. Mottagaren är s.k. elektronacceptor.
Förstärkt biologisk deklorerings	Ingår som del i begreppet förstärkt biologisk självrening. Innefattar de metoder som med biologiska ämnen (mikroorganismer, svampar etc.) förstärker/påskyndar de naturliga självrenande egenskaperna specifikt avseende deklorerande processer. Förstärkt mikrobiell deklorerings kallas ibland också mikrobiell reaktiv deklorerings.
Förstärkt biologisk självrening	Ingår som del i begreppet förstärkt naturlig självrening. Innefattar alla de metoder som använder sig av biologiska ämnen, till exempel bakterier, för att förbättra/förstärka den naturliga självreningen. Här ingår både biologisk oxidativ nedbrytning (avseende klorerade etener främst vinylklorid) och biologisk reaktiv nedbrytning (för klorerade vanligtvis s.k. mikrobiell reaktiv deklorerings).
Förstärkt mikrobiell deklorerings	Den del av förstärkt biologisk deklorerings som nyttjar mikroorganismer för deklorerings.
Förstärkt mikrobiell självrening	Den del av förstärkt biologisk självrening som nyttjar mikroorganismer för nedbrytning.
Förstärkt naturlig självrening, FNS	Brett begrepp i vilket ingår alla de metoder som på något sätt, med mänskligt ingripande, förstärker de naturliga självrenande egenskaperna (utspädning, fastläggning, kemisk och biologisk nedbrytning etc.). Uttrycket "naturlig självrening" började användas av SGI 2004 (Larsson och Lind, 2004) och "förstärkt naturlig självrening" av SGI 2009 (Larsson, 2009). På senare tid har uttrycket "Förstärkt naturlig nedbrytning" börjat användas för biologisk nedbrytning. SGI anser att det är en alltför snäv definition då förstärkt naturlig nedbrytning istället bör vara synonymt med förstärkt naturlig självrening.
Ganglia	Med ganglia av klorerade lösningsmedel (DNAPL) menas större eller mindre, osammanhängande, ej mobila, droppar av DNAPL i jord, även kallat residualmättnad av DNAPL.
Isomer	Olika kemiska föreningar som har samma molekylformel. T.ex. är <i>cis</i> -DCE (benämns även <i>cis</i> -1,2-DCE), <i>trans</i> -DCE (benämns även <i>trans</i> -1,2-DCE) och 1,1-DCE isomerer med den gemensamma molekylformeln C ₂ Cl ₂ H ₂ .
Metabol process	Process/reaktion i cellens enzym som resulterar i energivinst för cellen och/eller celluppbyggnad.
Naturlig självrening	Naturliga processer som minskar halter och mängder av förorening. Processerna sker utan mänskligt ingripande.
ORP	Oxidation-reduktion potential.
Oxidativ nedbrytning	Nedbrytning via oxidation (snabb oxidativ nedbrytning kräver vanligtvis högt – mycket högt redox).
Reduktiv deklorerings	Deklorering av klororganiska föreningar som sker reaktivt, vanligtvis vid lågt-mycket lågt redox. Det mest vanligt förekommande är då en kloratom på en klororganisk molekyl ersätts med en väteatom. I vissa fall kan dock reaktiv deklorerings innebära att en eller flera kloratomer tas bort från molekylerna utan att de ersätts. Det är vanligast vid kemisk deklorerings, i motsats till biologisk, framför allt mikrobiell, reaktiv deklorerings där kloratom vanligtvis ersätts med väte och kräver lågt-mycket lågt redox (samt väte).
SHE	Standard Hydrogen Electrode. Standardiserad väteelektrod.

Bilaga 1

**Fördjupad information:
Mikroorganismer, reduktiv – oxidativ
nedbrytning, bio-stimulering/-augmentation**

Innehållsförteckning

1. Unika mikroorganismer	4
1.1 <i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	4
1.2 Predatorer.....	5
2. Reduktiv deklorering och oxidativ nedbrytning	6
2.1 Metabolism och cometabolism, allmänt	6
2.2 Reduktiv deklorering.....	7
2.3 Oxidativ nedbrytning.....	17
3. Mikrobiella metoder i fullskala.....	24
3.1 Inledning	24
3.2 Metodalternativ	25
3.3 Biostimulering	25
3.4 Bioaugmentations.....	36
3.5 Kostnader	43
3.6 Biobarriär	46
4. Reaktionsvägar	48

1. Unika mikroorganismer

Vissa stammar inom bakteriearten *Dehalococcoides ethenogenes* (*Dhc*) har visat sig ha den unika förmågan att metaboliskt reduktivt deklorera framför allt vinylklorid (VC). Inledande information om denna art samt om vissa av dess stammar ges nedan, följt av ett kort avsnitt med information och predatorer till bl.a. dessa bakterier. I efterföljande kapitel beskrivs de unika stammarna mer ingående, bl.a. tillsammans med de kända gener som stammarna besitter och som ligger bakom produktion av de enzym som mikroorganismerna använder i den metabola dekloreringsprocessen.

1.1 *Dehalococcoides ethenogenes*

Bakterier brukar namnges med släkt- och artnamn, till exempel *Dehalococcoides ethenogenes*. Första delen av namnet hänvisar till släktet *Dehalococcoides* och andra delen till arten *ethenogenes*. Ett släkte kan bestå av många olika arter och om en speciell art inte är känd anges endast vilket släkte den tillhör, t.ex. *Dehalococcoides* sp. Tillägget sp. (förkortning av species) efter släktnamnet betyder att benämningen gäller en art inom det givna släktet som man lyckats att renodla men vars art man ännu inte genetiskt kartlagt. Om sp. är utbytt mot spp., så menas att det gäller flera opreciserade arter inom samma släkte. Det kan t.ex. handla om att en speciell egenskap finns hos flera arter inom samma släkte men att man genetiskt inte kunnat fastställa vilka arter det är. Slutligen, en art kan ha flera stammar. Exempel på en stam är *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195, där strain 195 är benämningen på specifik stam.

Bakteriearten *Dehalococcoides ethenogenes* har en särställning inom mikrobiell sanering av klorerade alifater. Nyligen föreslogs att *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 ska namnändras till *Dehalococcoides mccartyi* strain 195 (Löffler *et al.*, 2013). Numera är det accepterat internationellt att dessa två namn (och organismer) är synonyma med varandra (Uniprot, 2015). Bakomliggande orsak är bl.a. att genomet hos *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 inte var fullt klarlagt innan Löffler *et al.* (2013) fastställde det och de tog då chansen att tilldela organismen *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 det synonyma namnet *Dehalococcoides mccartyi* strain 195. Detta gjordes för att hedra den i vetenskapliga kretsar välkände Dr. Perry L. McCarty för hans visionära bidrag till miljövetenskap och miljöteknik, bl.a. inom området mikrobiell reduktiv deklorering, inte minst kopplat till *Dehalococcoides*.

Löffler *et al.* (2013) föreslog att alla kända *Dehalococcoides* sp. med förmåga att metaboliskt deklorera främst lågklorerade etener, t.ex. stammarna *Dehalococcoides* sp. strain BAV1 och *Dehalococcoides* sp. strain FL2, också skulle namnändras. De föreslogs få namnen *Dehalococcoides mccartyi* strain BAV1, *Dehalococcoides mccartyi* strain FL2, etc. Det kan tilläggas att benämningen *Dehalococcoides mccartyi* även börjat användas för vissa mikroorganismer som metaboliskt deklorerar triklorbensener (Löffler *et al.*, 2013b) och polyaromatiska högklorerade PCB (Bedard, 2014).

En sökning på Internet, våren 2016, visade att benämningen *Dehalococcoides mccartyi* börjat anammas, men att *Dehalococcoides ethenogenes* fortfarande är det namn som till största delen används. En orsak kan eventuellt vara att det vid denna tidpunkt är oklart om föreslagen namnändring har accepterats för alla idag, och framtida, kända stammar av *Dehalococcoides* sp. med förmåga att utföra reduktiv deklorering.

Eftersom de allra flesta referenser i denna publikation är från tiden innan 2013 används benämningen *Dehalococcoides mccartyi* endast då detta anges i referensen. I annat fall används generellt benämningen *Dehalococcoides ethenogenes*. Benämningarna används alltså parallellt och avser samma art.

1.2 Predatorer

Protozoer (protozoa) är mikroorganismer som livnär sig på/äter upp bakterier, t.ex. bakterier som bryter ned klorerade lösningsmedel. Virus (phages) kan attackera bakterier och utnyttja dem för förökning, samtidigt som bakterien dör. Dessa protozoer och virus frodas där det finns lämpliga bakterier, t.ex. i akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel.

Hur dessa predatorer påverkar nedbrytningen av klorerade lösningsmedel i en akvifär är idag inte klarlagt. Enligt Meckenstock *et al.* (2015) finns motstridiga bevis på protozoers påverkan på bakteriestatus. Protozoer kan ibland motverka biologisk nedbrytning av föroreningar men i andra fall det motsatta, dvs. stimulera sådan nedbrytning (t.ex. om predatorerna främst attackerar bakterier som inte utför nedbrytning av föroreningen).

Endast ett fåtal studier finns på virus i grundvatten som nyttjar bakterier i sin förökning. Ingen information har hittills gått att finna som gäller virus eventuella påverkan på bakteriell nedbrytning av klorerade lösningsmedel. Meckenstock *et al.* (2015) anser att virus kan förväntas spela en viktig kontrollerande roll för tillväxten av bakterier. Man anser det rimligt att förutsätta att när tillväxten av högspecialiserade bakteriepopulationer, som utför biologisk nedbrytning av föroreningar, blir alltför omfattande så kommer protozoer och virus att angripa och reducera sådan tillväxt.

2. Reduktiv deklorering och oxidativ nedbrytning

I det följande ges information om kända mikroorganismer och gener som idag kopplas till reductiv deklorering och oxidativ nedbrytning av klorerade alifater. Ett flertal av dessa bör ingå i ordinarie analysprogram vid undersökning och sanering med mikrobiella metoder av markområden förorenade med klorerade lösningsmedel. Fokus har främst lagts på mikroorganismer kopplade till nedbrytning av klorerade etener. Internationell forskning har kommit längst vad gäller mikrobiell detektering, identifiering och koppling mellan olika mikroorganismer och gensekvenser när det gäller nedbrytning av klorerade lösningsmedel. Forskning kring mikrobiell nedbrytning av många andra halogeninnehållande organiska föroreningar har inte kommit lika långt.

Mikrobiell nedbrytning av en förening utförs av organismens enzymer och kan reaktionsmässigt ske metaboliskt eller cometaboliskt. Vid nedbrytning av de allra flesta klorerade alifater kan de båda alternativen ske i form av reductiv deklorering men för en del klorerade alifater kan de båda alternativen även ske i form av oxidativ nedbrytning. Nedan ges först information om metabolism och cometabolism. I efterföljande avsnitt ges information om reductiv deklorering och oxidativ nedbrytning.

2.1 Metabolism och cometabolism, allmänt

Med metabolism menas att mikroorganismen utför kemisk reaktion med hjälp av organismens enzym så att organismen erhåller energi och/eller molekyländelar för tillväxt av sina celler.

Med cometabolism menas att reaktionen sker med hjälp av organismens enzym (eller ibland med andra delar i cellen) men utan att organismen erhåller energi och tillväxt.

Cometabola reaktioner sker mera sällan. Därmed sker den totala nedbrytningen avsevärt långsammare jämfört med metabola reaktioner. Exempelvis har cometabol nedbrytning av klorerade alifater halveringstider (tiden det tar att halvera mängden eller halten av föreningen) från något/några år upp till ca 20 år (Wymore *et al.*, 2007). Metabola nedbrytningar av klorerade alifater kan ha halveringstider som är en eller flera tiopotenser kortare. Halveringstiderna beror även på om nedbrytningen är oxidativ eller reductiv, vilken molekyl som ska brytas ned, etc. För vissa klorerade alifater kan oxidativ nedbrytning gå avsevärt snabbare än deras reductiva deklorering, och vice versa för andra.

När en molekyl bryts ned cometaboliskt sker det i princip av en slump ("av bara farten"), samtidigt som organismen håller på att metaboliskt bryta ned en helt annan sorts molekyl. Samma enzym som organismen har bildat för den metabola nedbrytningen utför den cometabola reaktionen. Den cometabola nedbrytningen av en förening kan alltså ske då organismen har aktiverat den metabola nedbrytningen av en annan förening. Antalet molekyler som då omvandlas cometaboliskt är vanligtvis mycket mindre per tidsenhet, jämfört med i den parallella metabola nedbrytningen.

Molekyler som utsätts för cometabol reaktion behöver inte vara strukturmässigt lika de molekyler som parallellt bryts ned metaboliskt. Däremot kan cometabola reaktioner gå fortare om molekylerna är någorlunda strukturmässigt lika. Detta gäller både vid cometabol reductiv deklorering och vid cometabol oxidativ nedbrytning. Ju högre halterna är av den förening som ska brytas ned metaboliskt, desto större potential för att antalet molekyler per tidsenhet som bryts ned

cometaboliskt ökar. Detta har att göra med att organismen kan producera mer enzym per tidsenhet ju högre halterna är av den förening som ska metaboliseras.

Det är inte alltid som denna ökade enzymproduktion får effekt. Det gäller t.ex. då kloreter oxideras cometaboliskt. Om totalhalterna av kloreter, som genomgår cometabol oxidation, är över 1 mg/l så hämmas enzymerna. De peroxider som bildas som mellanprodukter (intermediärer) vid den cometabola oxidationen är reaktiva och har stark hämmande/nedbrytande effekt på organismens enzym (Semprini, 2013). Intressant nog så kan peroxider även bildas vid oxidativ metabol nedbrytning, men dessa enzym är mindre mottagliga för de metabolt bildade peroxidernas toxiska effekt.

På senare tid har kunskapen om mikrobiella reductiva metabola och cometabola processer, kopplade till nedbrytning av klorerade etener ökat. Internationell forskningsfokus ligger idag på genetisk forskning kring metabol deklorering av dessa etener. Den internationella kunskapen om alternativ oxidativ metabol nedbrytning av lågklorerade etener vid låga syrehalter har ökat under de senaste åren. Därför beskrivs i Avsnitt 2.3 nedan metabol och cometabol oxidation i två separata underavsnitt, medan i Avsnitt 2.2 tas metabol och cometabol reductiv deklorering upp i ett gemensamt underavsnitt.

2.2 Reduktiv deklorering

2.2.1 Metabol och cometabol deklorering

Metabol deklorering går vanligtvis avsevärt snabbare än cometabol dito varför dagens biostimulering och bioaugmentation för sanering av klorerade lösningsmedel har sitt fokus på metabol deklorering (biostimulering och bioaugmentation beskrivs i Kapitel 3). Därför ligger huvudsakligt fokus i detta avsnitt på metabol deklorering.

Erfarenheter från laborietester och fullskalesaneringar har visat att det mest kritiska steget vid nyttjandet av mikrobiell reductiv deklorering av klorerade etener är dekloreringen av vinylklorid (VC) till eten samt i viss mån av *cis*-dikloreten (*cis*-DCE) till VC. Detta beror sannolikt på att det finns avsevärt fler bakteriearter som metaboliskt kan reductivt deklorera högklorerade etener som perkloreten (PCE) och trikloreten (TCE) än lågklorerade etener som dikloreten (DCE) och VC.

Vid mikrobiell reductiv deklorering nyttjas de klorerade kolvätena som elektronacceptorer. Elektronerna tas från olika elektrondonatorer, vanligtvis väte, och de sammantagna metabola processerna genererar energi och byggstenar till mikroorganismens celluppbyggnad. Detta väte är nödvändigt för att mikrobiell deklorering av lågklorerade etener ska kunna ske.

Däremot, vid deklorering av högklorerade etener finns ett flertal mikrobiella släkter och arter som inte använder väte som sin huvudsakliga elektrondonator. Istället använder de olika fettsyror (mjölksyra/laktat, butyrat/smörtsyra, etc.). Oavsett elektrondonator så kallas dessa metabola reductiva processer för klorrespiration.

Exempel på olika mikroorganismer som kan metabolt deklorera PCE till TCE och vidare till *cis*-DCE ges i Tabell 2.1. Det finns en stor variation av mikroorganismer som metaboliskt kan utföra sådan deklorering. Detta indikerar att det finns stor potential för mikrobiell deklorering av högklorerade etener vilket skulle kunna utnyttjas vid efterbehandling av förorenade områden.

Tabell 2.1 Exempel på mikroorganismer som kan deklorera PCE och TCE metaboliskt, men inte DCE (och VC) (undantaget *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195) **a/**.

Bakterie	Elektron donator
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> strain 195 a/	Väte
<i>Dehalobacter restrictus</i> b/	Väte
<i>Dehalobacter restrictus</i> strain PERK-23 c/	Väte
<i>Dehalobacter restrictus</i> strain TEA c/	Väte
<i>Geobacter lovleyi</i> sp. strain SZ e/	Väte, pyruvat
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> strain BB1 c/	Acetat, pyruvat, lactat, succinat, fumarat, malat
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> strain BRs1 c/	Acetat, pyruvat, lactat, succinat, fumarat, malat
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> strain TT4B b/	Acetat, pyruvat
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain PCE1 b/, d/	Laktat, pyruvat, butyrat, etanol m.m.
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> sp. strain TCE1 c/	Väte
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i> b/	H ₂ , format, pyruvat, m.m.
<i>Clostridium bifermentans</i> strain DPH1 c/	Väte
<i>Enterobacter agglomerans</i> b/	Icke-fermenterbara substanser

a/ Strain 195 kan metaboliskt deklorera PCE, TCE och cDCE samt cometaboliskt deklorera VC, Tabell 2.2.

b/ Utför även cometabolisk deklorering, bl.a. av VC (Gossett och Zindler, 1997; Maymó-Gatell *et al.*, 1999).

Sulfurospirillum halorespirans kallades tidigare *Dehalospirillum multivorans* (Löffler *et al.*, 2013b).

c/ Zaa (2008); Zaa *et al.*, (2010).

d/ Kan enbart deklorera PCE medan strain PCE-S även kan deklorera TCE (Löffler *et al.*, 2013b).

e/ Sung *et al.* (2006b); Löffler *et al.* (2013b).

Däremot finns det bara ett hittills känt släkte, *Dehalococcoides* (*Dhc*), med en identifierad art, *Dehalococcoides ethenogenes*, samt några oidentifierade arter, *Dehalococcoides* spp., som har några stammar med förmågan att metaboliskt deklorera lågklorerade etener. Dessa stammar är inte allmänt förekommande och när de förekommer så föreligger de ofta i låga halter. Därför är det vanligt att dekloreringsprocessen stannar upp vid DCE och VC. Detta kallas stallning. Dessa stammar kräver att både väte (löst i vattnet) och klorerad eten finns tillgängligt. Om halten av något av dessa ämnen blir alltför låg, inte minst av vätet, så slutar de att växa, deras aktiviteter upphör och populationen minskar eller dör ut.

En av stammarna är *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. Det är den enda kända bakterie som utför deklorering av både PCE, TCE, *cis*-DCE och VC liksom av *trans*-DCE och 1,1-DCE. Strain 195 deklorerar samtliga av dessa kloreterener metaboliskt. Undantaget är *trans*-DCE och VC som dekloreras cometaboliskt. De stammar av *Dhc* som idag är kända att kunna deklorera klorerade etener ges i Tabell 2.2, exempelvis *Dehalococcoides* sp. strain BAV1.

För att säkerställa att *Dhc* föreligger i ett prov, samt för att få indikation på koncentration (antal per liter eller per ml), utför man numera analys av en viss gensträng i dess arvsmassa. Gensträngen kallas 16S rRNA och dess uppbyggnad i *Dhc* anses vara unik för just *Dhc*. Man har därför kartlagt i detalj hur denna gensträng i *Dhc* är uppbyggd och använder den för att genetiskt identifiera *Dehalococcoides* spp. Observera att denna gensträng endast identifierar släktet *Dehalococcoides* spp. Den kan inte identifiera art eller stam.

I undantagsfall kan man erhålla falsk analysrespons med denna sträng eftersom den kan finnas i någon/några andra mikroorganismers 16S rRNA som inte deklorerar t.ex. klorerade etener. Exempelvis har man visat att *Dhc* har till 90 % samma 16S rRNA som två stammar av arten *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*. De senare utför deklorering av klorerade etaner men inte av klorerade etener (Yan *et al.*, 2009), undantaget *trans*-1,2-DCE (Sirem, 2015). Nyligen detekterades arten *Dehalogenimonas alkenigignens* och den visade sig inneha 16S rRNA som uppvi-

sade 96 % likhet med motsvarande i förstnämnda *Dehalogenimonas*. Också den arten har en eller flera stammar som kan deklorera bl.a. klorerade etaner men inte klorerade etener (Bowman *et al.*, 2013).

Tabell 2.2 Olika stammar/strains av *Dehalococcoides* spp. som kan utföra deklorering av olika klorerade etener. M = metabol deklorering; C = cometabol deklorering.

Strain 1/	PCE	TCE	cDCE	tDCE	1,1DCE	VC	1,2DCA	Referens
BAV1	C	C	M	M	M	M	M 3/	Holmes <i>et al.</i> , 2006; Johnson, 2007
VS	-	M	M	-	M	M	-	Holmes <i>et al.</i> , 2006; Johnson, 2007
GT	-	M	M	-	M	M	-	Sung <i>et al.</i> , 2006; Holmes <i>et al.</i> , 2006
195	M	M	M	C	M	C	-	Maymó-Gatell <i>et al.</i> , 1997; 1999
FL2	C 2/	M	M	M	-	C	-	Holmes <i>et al.</i> , 2006; Johnson, 2007
CBDB1	C	C	-	-	-	-	-	Löffler <i>et al.</i> , 2013b.

1/ Stammar av *Dehalococcoides* spp.

2/ Enligt Zaa (2008) finns indikationer på att detta steg eventuellt kan utföras metaboliskt.

3/ BAV1 har nyligen visats kunna metaboliskt deklorera 1,2-dikloretan/1,2-DCA (Löffler *et al.*, 2013b).

Om man i fält finner *Dhc*, detekterade med gängse 16S rRNA, men ingen deklorering av de vanliga klorerade etenerna, så kan orsaken hypotetiskt alltså vara att man egentligen detekterat *Dehalogenimonas* (Löffler *et al.*, 2013b). Det skulle i sin tur kunna resultera i feltolkningar av den mikrobiella statusen inför beslut om behov av bioaugmentation. Det finns risk för fler feltolkningar eftersom *Dehalogenimonas* kan bilda VC genom deklorering av 1,1,2-trikloretan (1,1,2-TCA) samt bilda en blandning av *cis*- och *trans*-DCE genom deklorering av 1,1,2,2-tetrakloretan (1,1,2,2-TeCA).

Några få internationella laboratorier har uppmärksammat dessa genetiska likheter och nyligen tagit fram s.k. primers med vilka man kvantitativt kan genetiskt separera *Dehalogenimonas* och *Dhc*. Om det finns indikationer på att kloretaner finns i kloretenförorenad akvifär så kan det därför vara viktigt att klargöra om aktuellt analyslaboratorium kan utföra denna separation.

Gensträng 16S rRNA används för identifiering av bakterien men den säger inget om möjlig genetisk potential för önskad deklorering. Det kan istället fås genom analys av vissa andra gener som idag är kartlagda och kända att koda för produktion av de enzymesystem som kan deklorera aktuella klorerade föreningar. Analys av 16S rRNA bör därför alltid utföras tillsammans med analys av dessa specifika gensekvenser.

För fullständig metabol deklorering av klorerade etener krävs bl.a. metabol deklorering av VC. Det är endast vissa stammar av *Dhc* som kan utföra detta. Flera enzym i *Dhc* har hypotetiskt denna förmåga men man har hittills endast kunnat detektera och kvantifiera två gensekvenser, kallade *vcrA* och *bvcA*, som kodar för produktion av sådana enzym. Dessa två gensekvenser kopplas idag även till produktion av enzym som kan metaboliskt deklorera DCE till VC.

I Tabell 2.3 redovisas de mest kända gensekvenserna som är kopplade till deklorering av olika klorerade etener. Motsvarande speciella mikrobiella stammar har olika tilläggsbeteckningar, t.ex. ”strain BAV1” i ovan nämnda *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. Analys av motsvarande gensekvenser, tillsammans med gensträngen 16S rRNA, kan idag utföras kommersiellt för en rimlig kostnad och rekommenderas för kvantifiering av potential för deklorering av klorerade etener. Undantaget är eventuellt gensekvensen *cbrA* som vanligtvis inte är fördelaktigt att bekosta analys av, eftersom den enbart utför cometabol, och därmed långsam, deklorering av klo-

rerade etener. Den är istället känd för att metaboliskt deklorera bl.a. olika PCB-kongener (Adrian *et al.*, 2009).

Gensekvensen *pceA* är inte enbart en indikation på närvaro av *Dhc*. Den (*pceA*) finns även i en del av de mikroorganismer som kan metaboliskt deklorera högklorerade etener (Hug *et al.* 2013; Futagami *et al.*, 2014). Genen *tceA* anses dock enbart kunna förknippas med *Dhc*. Därtill, de ovan nämnda generna *vcrA* och *bvcA* anses vara de enda hittills kända som enbart kan kopplas till både *Dhc* och till dess metabola deklorering av lågklorerade etener.

Tabell 2.3 Kända gensekvenser i olika stammar av *Dehalococcoides* sp. som kan kopplas till reduktiv deklorering av klorerade etener.

Gensekvens	<i>Dehalococcoides</i>	Referens	Kodar prod. av enzym som utför	Referens
<i>pceA</i>	<i>ethenogenes</i> strain 195	NAVFAC, 2011	PCE → TCE	NAVFAC, 2011
<i>tceA</i>	<i>ethenogenes</i> strain 195, sp. strain FL2	Magnuson <i>et al.</i> , 1998; He <i>et al.</i> , 2003; Lee <i>et al.</i> , 2011	(PCE →) TCE → <i>cis</i> -DCE → VC (→ eten) 1/; 5/	Magnuson <i>et al.</i> , 1998; Smits <i>et al.</i> , 2011
<i>cbrA</i>	sp. strain CBDB1	Wagner <i>et al.</i> , 2009	(PCE → TCE → <i>cis</i> -DCE) 1/	Löffler <i>et al.</i> , 21013b
<i>vcrA</i>	sp. strain VS, sp. strain GT	Müller <i>et al.</i> , 2004; Behrens <i>et al.</i> , 2008; Sung <i>et al.</i> , 2006; Lee <i>et al.</i> , 2011	(TCE →) DCE → VC → eten 2/	Popat och Deshusses, 2011
<i>bvcA</i>	sp. strain BAV1	Krajmalnik-Brown <i>et al.</i> , 2004	(PCE → TCE →) DCE → VC → eten 1/; 3/; 4/	

1/ Med parentes menas att enzymet, som motsvarande gen är kodar för, inte utför reaktionen metaboliskt utan i bästa fall endast stödjer reaktionen cometaboliskt.

*2/ Enligt Löffler *et al.* (2013b) är TCE → DCE oklart för *vcrA* men det kan kopplas till metabol deklorering av annan/andra DCE än enbart *cis*-DCE.*

*3/ DCE (både *trans* och *cis*) → VC oklart för *bvcA* enligt Löffler *et al.* (2013b). Damgaard *et al.* (2013) ger liknande indikation.*

*4/ Enligt Cheng *et al.* (2010) är strain BAV1 den enda stam av *Dehalococcoides ethenogenes* som kan deklorera *trans*-DCE.*

*5/ Enligt Cheng *et al.* (2010) kan strain 195 även deklorera TCE till *trans*-DCE men oklart om det sker metabolt eller cometabolt samt oklart om det är kopplat till *tceA*. Enligt Johnson *et al.*, (2005) kan strain 195 bilda *trans*-DCE men inte nyttja det metaboliskt.*

Det finns idag kommersiella möjligheter att analysera alla de i Tabell 2.3 givna gensekvenser i både mikroorganismernas DNA och RNA. Skillnaden i kostnad för analys i RNA vs. DNA är liten, men krav på maximal transporttid (från provtagning i fält till provberedning på laboratorium) skiljer sig markant åt. Analys av RNA måste utföras inom ett dygn efter provtagning, medan ca dubbelt så lång transporttid kan accepteras för DNA-analys. Det beror bl.a. på att RNA är mer instabilt än DNA.

Om det är möjligt bör man utföra RNA-analys istället för DNA-analys. Orsaken är att det inte räcker med närvaro av de i Tabell 2.3 angivna gensekvenserna i mikroorganismernas DNA för att deras metabola deklorering ska utföras. Det krävs också att dessa gensekvenser, som alltså kodar för produktion av dekloreringsenzym (i de här fallen kallade reduktaser), är ”påslagna” i deras DNA, dvs. kopierade in i deras temporärt aktiva RNA. Finns gensekvensen i RNA så är alltså sannolikheten mycket stor att det pågår produktion av motsvarande enzym, och därmed pågår även motsvarande deklorering. Gensekvens analyserad i DNA ger enbart besked om potential för motsvarande enzymproduktion.

Det finns undantag. Enligt Löffler *et al.* (2013) kan genen *tceA* i undantagsfall detekteras i RNA utan att motsvarande enzym produceras. Dessutom har halter av *tceA* dålig korrelation till hastighet och omfattning av motsvarande deklorering (Da Silva och Alvarez, 2008).

Man har på senare tid funnit mikroorganismer inom släktet *Dehalococcoides* som har förmåga att metaboliskt deklorera PCE och TCE med enzym vars produktion kodas av andra genssekvenser än vad som anges i Tabell 2.3. Generna är dock ännu inte fastställda. Exempel på sådana mikroorganismer är *Dehalococcoides ethenogens* 195 (Cheng och He, 2009; Cheng *et al.*, 2010). Denna organism kan under vissa förutsättningar producera avsevärt mer av *trans*-DCE än *cis*-DCE vid deklorering av TCE. Normalt producerar de allra flesta mikroorganismer, som deklorerar TCE, istället mest av *cis*-DCE. Det är dock oklart om det sker metaboliskt eller inte. Sammantaget innebär detta att om halten *cis*-DCE inte markant överskrider halten av *trans*-DCE så kan man inte utesluta att mikrobiell deklorering av TCE ändå pågår (Griffin *et al.*, 2004).

Förutom *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 och *Dehalococcoides* sp. strain FL2 verkar en del av de inledningsvis ovan angivna mikroorganismerna (de som enbart deklorerar högklorerade etener) inneha generna *pceA* och/eller *tceA* med produktion av motsvarande klorrespirerande enzymer. Exempelvis, *Desulfitobacterium* sp. strain Y51, *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1, *Desulfitobacterium hafniense* strain Y51 och *Dehalobacter restrictus* strain PER-K23 innehar alla genen *pceA* (Suyama *et al.*, 2002; Duret *et al.*, 2012; Reinhold *et al.*, 2012; Rupakula *et al.*, 2013). Motsvarande enzym kan, förutom att deklorera PCE/TCE, även deklorera flera högklorerade etaner. Den sistnämnda arten (*Dehalobacter restrictus*) har visat sig vara en huvudaktör vid metabol deklorering av högklorerade etener och klorerade etaner. Det beror sannolikt på bl.a. genen *pceA*.

Släkte och art av dessa bakterier kan, liksom för *Dhc*, bestämmas genom analys av 16S rRNA i deras gener. Detta ingår i en del av de standardiserade analyspaket av gener i vatten och jord som erbjuds internationellt.

I definitionen av klorerade lösningsmedel ingår, förutom klorerade etener, även klorerade metaner och etaner. Några av ovan nämnda släkten/arter/stammar av mikroorganismer kan, förutom metaboliskt deklorera etener, även metaboliskt deklorera vissa etaner. Exempelvis kan *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 metaboliskt deklorera 1,2-DCA direkt till eten (dvs. inte via några mellanprodukter, men upp till ca 1 % VC kan ändå bildas via sidoreaktion) (Maymó-Gatell *et al.*, 1999). *Desulfitobacterium dichloroeliminans* strain DCA1 deklorerar 1,2-DCA direkt till eten (100 %) samt 1,1,2-TCA till VC (De Wildeman *et al.*, 2003). *Dehalobacter* strain TCA1 och strain MS deklorerar endast 1,1,1-TCA och 1,1-DCA (Grostern och Edwards, 2006b).

Därtill kan bl.a. *Dehalococcoides* sp. strain BAV1 och *Dehalobacter* sp. nyttja 1,2-DCA metaboliskt (Grostern och Edwards, 2006). *Desulfitobacterium* sp. strain PR kan metaboliskt deklorera 1,1,2-TCA till 1,2-DCA, men organismen utför endast cometabol deklorering av 1,2-DCA (till klorethan) (Zhao *et al.*, 2015). *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 har visat sig kunna partiellt deklorera hexa-, penta- och tetraklorethaner, men om det sker metaboliskt eller cometaboliskt är inte klarlagt (De Wildeman *et al.*, 2003).

Tetraklormetan (CT) kan mikrobiellt reduktivt dekloreras till triklormetan (CF), och vidare till diklormetan (DCM), klormetan (CM) och etan via biostimulering med kolkällor som via fermentation bildar väte. Ju mindre klor i dessa metanbaserade molekyler, desto lägre redox krävs för att signifikant reduktiv deklorering ska erhållas. CT kan reduktivt dekloreras vid redox som motsvarar intervallet denitrifikation – metanogenes (se Avsnitt 3.2 i huvuddokumentet). För CF gäller redoxintervallet järnreduktion – metanogenes. För signifikant deklorering av DCM och CM krävs redox motsvarande sulfatreduktion. Generellt gäller att ju lägre redox desto större potential för signifikant deklorering, inte minst om man samtidigt tillför substrat, t.ex. mjölksyra/laktat (Puigserver *et al.*, 2016).

Vid höga halter kan deklorering av CT till CF ge negativa effekter på fortsatt deklorering. Orsaken är att fria radikaler ($\bullet\text{CCl}_3$) lätt bildas. Dessa radikaler hämmar cellen, dess enzym och därmed fortsatt nedbrytning. Det finns dock mikrobiella sätt att minska denna toxiska effekt. Man har funnit att mikroorganismen *Pseudomonas stutzeri* strain KC har förmågan att deklorera CT utanför cellen (cellen utsöndrar ett sekret, kallat PDTC, som utför dekloreringen utanför cellen), varvid eventuella fria radikalers negativa påverkan inne i cellen uteblir. Bioaugmentation med strain KC anses nu vara att föredra vid sanering av CT-förorenade akvifärer. Man har till och med förslagit att ytterligare påskynda processen genom tillsats av PDTC (Criddle *et al.*, 2013).

Hug *et al.* (2013) ger en sammanställning av mikroorganismer kända att inneha gener för produktion av olika dehalogenas enzymer (som kan metaboliskt deklorera olika klorerade föreningar).

Exempel på kommersiella analyser av deklorerande mikroorganismer och gener som kodar för produktion av enzym som kan kopplas till metabol reduktiv deklorering av klorerade etener ges i MI (2015c) och i Bioclear (2015b). Sannolikt kommer det snart att även vara möjligt att vid kommersiella laboratorier analysera nyckelproteiner kvantitativt, t.ex. enzymer som deklorerar VC. Det skulle kunna ge ett direkt svar (liksom analys av RNA) på reell dekloreringsaktivitet i ett prov. Därtill kommer kommersiella laboratorier snart att erbjuda analys med s.k. DNA microarrays med vilka man ytterst detaljrikt kan karaktärisera hela det mikrobiella samhället i ett förorenat område (Stroo *et al.*, 2013).

2.2.2 Elektrondonatorer

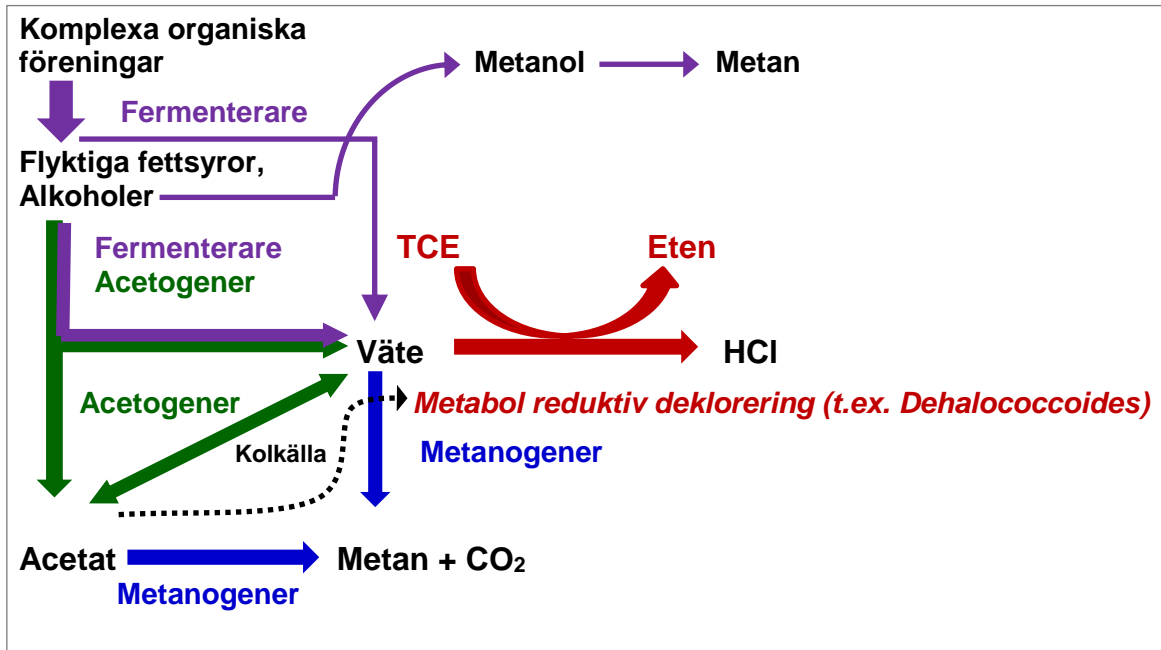
Mikrobiell deklorering kräver, förutom mikroorganismer, kemiska ämnen som deltar i eller stödjer den mikrobiella dekloreringen.

För att en metabol reaktion ska ske krävs att något ämne lämnar ifrån sig minst en elektron, dvs. agerar som elektrondonator. Vid deklorering av klorerade etener och etaner är väte vanligtvis den primära elektrondonatorn. Detta väte kan t.ex. bildas av vissa mikroorganismer, s.k. fermenterare. Dessa organismer utför fermentation av substratet/kolvätekällan (t.ex. socker/melass) varvid bl.a. väte bildas. Elektronerna i detta väte nyttjas därefter i bakteriecellen för energi- och celluppbyggnad i de mikroorganismer som utför dekloreringen genom att de, samtidigt med dekloreringen, splittrar vätemolekylen ($\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$).

Produktion av väte kan exemplifieras med fermentation av glukos, varvid smörsyra (som i sin tur fermenteras till ättiksyra), acetat (jon av ättiksyra), koldioxid (karbonat) och väte bildas i olika steg. Summareaktionen som bildar acetat är:



Det bildade vätet är en gas men då fermentationen sker i grundvattnet löser sig en del i grundvattnet. Detta lösta väte nyttjas av de närvarande bakterierna, Figur 2.1.



Figur 2.1 Schematisk beskrivning av mikrobiellt samspel och konkurrens för fullständig metabol reduktiv deklorering kopplad till fermentation/produktion av väte samt konkurrerande vätekonsumtion. Sammanställning baserad på underlagsdata från ITRC (2008), Hug (2012) och Edwards (2013).

Sammantaget genereras både näringsämnen och väte vid fermentationen, vilka i sin tur är viktiga förutsättningar för de mikroorganismer som utför deklorering. Emellertid föreligger konkurrens, både kemiskt och mikrobiellt, om att nyttja det bildade vätet. Om alltför mycket väte produceras kan metanogener använda vätet för att bilda metan som i värsta fall kan bli så omfattande att explosionsrisk föreligger.

I Figur 2.1 produceras vätet via mikrobiell fermentation. Vätet kan också produceras rent kemiskt av t.ex. nollvärt järn i vatten med lågt redox, s.k. anaerob korrosion av järn:



Tillsats av nollvärt järn till kloralifat-förorenad akvifär kan alltså stimulera den mikrobiella dekloreringen. Därtill kan det nollvärda järnet även utföra rent kemisk deklorering. Det senare ingår i begreppet ISCR (*in situ* chemical reduction) och används ibland som ensam metod, eller i kombination med mikrobiell reduktiv deklorering för att påskynda nedbrytningen. Den kemiska reaktiva reaktionen har fördelen att den inte bildar VC, jämfört med den mikrobiella dekloreringen (närvaro eller tillsats av *Dhc*, se föregående avsnitt, kan dock avsevärt minska problemet med VC).

Tillsats av nollvärt järn bör dock endast utföras i lämpliga akvifärer. Om akvifären innehåller sulfid kan detta tillsammans med Fe^{2+} bilda utfällningar som minskar akvifärens permeabilitet. I vissa fall kan det vara fördelaktigt att minska den hydrauliska konduktiviteten något, t.ex. om det finns behov av en längre uppehållstid för föroreningarna och deras nedbrytningsprocesser. Det kan då ge en mer fullständig deklorering, inte minst om den reaktiva nedbrytningen sker i ett avgränsat område med högt grundvattenflöde.

Det kan tilläggas att om det nollvärda järnet är i form av nanopartiklar finns indikationer på att alltför låg (<0,05 g/l) och alltför hög (>2 g/l) slutlig koncentration av sådant nollvärt järn i akvifären kan hämma dekloreringsprocessen. Bakomliggande orsaker är inte fastställda (Velimirovic *et al.*, 2015).

Konkurrens om vätet föreligger både mikrobiellt och kemiskt. Om det finns geokemiska elektronacceptorer i akvifären (syre, järn, mangan, nitrat etc.) så kan dessa elektron-acceptorer konsumera detta väte kemiskt. Ju lägre redox, desto lägre halter finns av dessa konkurrerande elektronacceptorer och desto större möjlighet för mikroorganismerna, eller för rent kemiska reaktioner (dvs. utan mikrobiell/biologisk inblandning), att vätet kan användas vid reduktiva reaktioner. Konkurrensen består alltså i att vid reduktiv deklorering agerar de klorerade kolvätena som elektronacceptorer, i konkurrens med alla andra närvarande elektronacceptorer.

Ju mindre andel klor det klorerade kolvätet har, desto mindre konkurrens om vätet måste föreligga för att det ska dekloreras reduktivt. Detta innebär bl.a. att det måste föreligga mycket lågt redox för mikrobiell deklorering av lågklorerade etener.

I Tabell 2.4 ges information från internationell litteratur som avser erforderlig vätekoncentration samt huvudsakliga geokemiska konkurrerande reaktioner. Observera att tabellvärdena för olika processer är ungefärliga. Varje plats/område har unika förutsättningar.

Tabell 2.4 Haltintervall av löst väte som behövs för dels reduktiv deklorering av klorerade etener (där de klorerade etenerna är elektronacceptorer) och dels för några konkurrerande geokemiska elektronacceptorprocesser.

Referens Slutlig elektronacceptorprocess	H ₂ halt i vatten (nanomol/liter) A/					Indikation
	Chapelle (2001)	AFCEE (2007)	Wrenn (2004) B/	MPCA (2006) C/	US EPA (1998)	USGS (2007)
Denitrifikation $2\text{NO}_3^- + 5\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	0,01-0,05	<0,1	<0,05-0,4	<0,1	<0,1	Ej nyckelprocess om nitrat <2,0 mg/l
Mangan(IV)reduktion $\text{MnO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{Mn(OH)}_2$	0,1-0,3	-	-	-	-	-
Järn(III)reduktion $2\text{Fe(OH)}_3 + \text{H}_2 \rightarrow 2\text{Fe(OH)}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	0,2-0,8	0,2-0,8	0,1-0,5	0,2-0,8	0,2-0,8	Indikation: Fe ²⁺ >1,0 mg/l
Sulfatreduktion $\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	1-4	1-4	1-4,5	1-4	1-4	Ej nyckelprocess om sulfid <0,05 mg/l
Metanogenesis $\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	5-15	5-20	2,5-24	5-15	5-20	-
Reduktiv deklorering $\text{R-Cl} + \text{H}_2 \rightarrow \text{R-H} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-	2-11	-	-	>1	Potential om syre <0,5 mg/l
Reduktiv deklorering av PCE	-	-	0,6-0,9	-	-	-
Reduktiv deklorering av TCE	-	-	0,6-0,9	-	-	-
Reduktiv deklorering av DCE	-	-	0,1-2,5	-	-	-
Reduktiv deklorering av VC	-	-	2-24	-	-	-

A/ 1 nanomol väte/liter = 1 nanomolar (1 nM) väte = 2×10^{-3} µg väte/liter (1 nanomol H₂ = 2 nanogram H₂).

B/ Referensen anger inte huruvida intervallvärdena för reduktiv deklorering är minimivärden, därtill bör troligtvis angiven nedre del av intervall för reduktiv deklorering av DCE ses som extremfall.

C/ Ref. anger att det finns bevis på att i kalla vatten som i Minnesota (som bör ha liknande grundvattentemperaturer som i Sverige) så kan deras angivna intervall vara generellt något för höga.

För bedömning av olika mikrobiellt lokala reduktiva zoner så anger MPCA (2006) att det är mer fördelaktigt att analysera löst vätgas, jämfört med vissa geokemiska elektronacceptor produkter. Den lösta vätgasen migrerar enbart marginellt nedströms i plymen, i motsats till järn, mangan och metan. De senare kan detekteras på signifikanta avstånd nedströms den plats de bildats. Det kan ge missledande information om redoxstatus i olika delar av plymen.

Provtagning och analys av löst vätgas kräver speciell utrustning och utförande i fält. Som exempel kan nämnas grundvattenrör av vätetäta material, speciella icke-elektriska grundvattenpumpar (t.ex. bladderpumpar eller peristaltiska pumpar), speciell glasbehållare med septum, lågt grundvattenflöde genom glasbehållaren (ca 500 ml/minut), invänta jämvikt (20-30 minuter), gastät spruta för provtagning i genererad luftblåsa i glasbehållaren, GC med speciell vätedetektor (Gas Reduction Detector), etc. (Chapelle *et al.*, 1997; Vroblesky och Chapelle, 2000; MCPA, 2006). Dessutom bör tiden mellan provtagning och analys vara så kort som möjligt, vilket innebär att den kan vara nödvändigt med ett fältlaboratorium.

Deklorering av TCE till *cis*-DCE med biostimulering kan öka när produktionen av metan ökar. Däremot kan ökad metanhalt ha motsatt effekt på fortsatt deklorering av bildade lågklorerade etener (Kean *et al.*, 2002). Detta kan t.ex. bero på att de olika dekloreringsprocesserna har olika optimala vätgasintervall, relativt optimalt intervall för metanproduktion. Av Tabell 2.4 fås att mikrobiell deklorering av TCE inte är lika krävande, vad gäller tillgång till väte, som deklorering av dess dekloreringsprodukter. Ökad konkurrens om vätet från metanproduktion kan alltså ha mindre negativ påverkan på den mikrobiella dekloreringen av TCE, än på fortsatt deklorering av dess nedbrytningsprodukter.

En del av de i Tabell 2.4 givna haltintervallen av löst vätgas bör betraktas som ungefärliga och för de geokemiska elektronacceptorerna som intervall för undre haltgränser. Exempelvis anges i tabellen att denitrifikation sker upp till 0,4 nM väte, medan reduktiv deklorering av PCE och TCE sker vid som lägst 0,6 nM väte, samt att nedre gränsen för deklorering av DCE går vid 0,1 nM. Bradley (2003) anger att den termodynamiska gränsen för genomförandet av reduktiv deklorering av PCE är möjlig (dock begränsad) då nitratreduktion föreligger samt att reduktiv deklorering av DCE och VC är ineffektiv under nitrat- och järn-reducerande förhållanden.

Sammantaget, mikrobiell reduktiv deklorering av PCE kräver redox som är lägre än nitratreduktion och för TCE krävs redox vid, eller lägre än, jämnreduktion. För DCE krävs redox motsvarande högst sulfatreduktion och för VC krävs redox motsvarande metanogenesis, för att signifikant mikrobiell reduktiv deklorering av dessa ska ske.

2.2.3 Elektronacceptorer

Den elektron som levererades av vätet måste efter utträttat arbete/energigivningen i cellen placeras i en slutlig elektronacceptor. Det är i detta slutsteg som den egentliga dekloreringen sker. Vid reduktiv deklorering agerar det klorerade kolvätet som sådan elektronacceptor varvid en elektron och halva vätgasmolekylen tas upp av den klorerade kolvätemolekylen. Samtidigt lämnar ett klor molekyl. Vätet tar alltså klorets plats och klore blir frigjord kloridjon. Slutprodukten blir saltsyra (HCl) vars vätejon ger en pH-sänkande effekt.

Vid reduktiv deklorering agerar alltså de klorerade kolvätena som elektronacceptorer varvid de kan få konkurrens om vätet av de geokemiska elektronacceptorerna, Tabell 2.4. Ju lägre redox desto mindre risk för denna konkurrens. Eftersom reduktiv deklorering av VC är den process som kräver relativt höga halter av väte så kräver denna process så lite konkurrens som möjligt av geokemiska elektronacceptorer, vilket är fallet vid lågt-mycket lågt redox. Vid sådana redox har deklorering av VC istället betydande vätekonkurrens av metanogener (i deras produktion av metan).

2.2.4 Kolkälla och näringsämnen

Utöver elektrondonator (väte) och elektronacceptor (det klorerade kolvätaet) behöver mikroorganismen kolkälla och andra ämnen för att bygga upp cellen. Exempel på kolkälla (substrat) är acetat. Exempel på andra ämnen är mineraler och vitamin B12 (det senare gäller för speciell stam av *Dhc*, se nedan). Detta vitamin behövs i vissa enzym för att de ska agera optimalt.

Alltför höga halter av substrat bör undvikas. Vissa mikroorganismer som utför deklorering, framför allt *Dhc*, fungerar bäst i relativt näringsfattig omgivning. Orsaken är bl.a. konkurrens med metanogener om vätaet. Metanogenerna kan växa till i alltför stor omfattning om det finns gott om lättfermenterbart substrat.

Motsatsen kan ibland gälla för vitamin B12. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 kan inte utföra deklorering om alltför låga halter av co-enzymet vitamin B12 föreligger. Dess deklorerande enzym består till del av detta co-enzym. Organismen kan inte själv bilda denna enzymdel utan den måste erhållas externt. Förmågan att utföra de metabola stegen (PCE ned till VC) och det cometabola steget (VC till eten) är alltså beroende av bl.a. tillgången av B12 (He *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2013). Det bör noteras att vitaminet B12 kan produceras av en del mikroorganismer som inte utför deklorering. Detta B12 kan därefter nyttjas av denna stam av *Dhc*. Extern tillsats av B12 är alltså inte alltid nödvändig för att strain 195 ska kunna utföra dekloreringen.

2.2.5 Reducerande ämnen

Det är viktigt att mycket låga redox föreligger vid mikrobiell reduktiv deklorering av lågklorerade etener. För att få rätt redox kan man behöva tillsätta reducerande ämnen, t.ex. natriumsulfid, L-cystein, DL-dithiothretiol, järnsulfid och/eller titan(III)citrat (Löffler *et al.*, 2013b). Tillsats av reducerande ämnen bör göras med måttlighet eftersom de flesta ämnena i sig, eller via fermentation, kan generera förändrat pH i akvifären. Exempelvis anger Steffan och Vainberg (2013) att slutliga halter av L-cystein över 0,69 mg/l kan inhibera eller slå ut konsortium av mikroorganismer (bl.a. *Dhc*), tillsätta (genom bioaugmentation) för att öka dekloreringshastigheten.

2.2.6 pH-buffert

Tillsats av reducerande ämnen och/eller elektron donatorer/biostimulering kan orsaka pH-ändring i akvifären. Vanligast är pH-sänkning, orsakad av fermentation av tillsatt elektrondonator (biostimulering). Därtill kan den mikrobiella reaktiva dekloreringen i sig sänka pH genom saltsyran (HCl) som bildas i processen. Alltför lågt (eller för högt) pH kan inhibera och i värsta fall slå ut de deklorerande mikroorganismerna, främst *Dhc*.

Xiao (2014) har sammanställt data från litteraturstudier och anger att pH 5,5-8,3 är det intervall inom vilket signifikant mikrobiell deklorering kan ske av högklorerade alifater. Yang (2012) fann att PCE-halten kunde halveras (via mikrobiell reduktiv deklorering till TCE) vid pH 5,5-6 under i övrigt fördelaktiga betingelser. Däremot är pH 6,0 den lägsta gränsen för signifikant mikrobiell deklorering av VC till eten.

Ovan givna pH-intervall stämmer väl överens med svenska erfarenheter. I ett svenskt pilotprojekt (Branzén och Ländell, 2017) detekterades pH 6,2-6,5 under den tid, och i de brunnar där signifikant deklorering av lågklorerade etener pågick. Samtidigt erhöles höga halter dels av eten, dels av *Dhc* och dels av gensekvenser som kodar för produktion av enzym som är kända för att deklorera lågklorerade etener. Dekloreringen av enbart högklorerade etener skedde vid lägre pH, huvudsakligen vid pH 5,5 samtidigt som höga halter detekterades av mikroorganismer kända att kunna deklorera enbart högklorerade etener (bl.a. *Dehalobacter restrictus*). Erfaren-

heterna tyder alltså på att deklorering av PCE kan ske vid betydlig lägre pH än deklorering av VC. Ju längre ned i reaktionsstegen $PCE \rightarrow TCE \rightarrow DCE \rightarrow VC$ → eten man ligger, desto närmare neutralt pH i grundvattnet krävs för att reaktionen ska kunna fortgå.

Om pH är alltför lågt justeras detta vanligtvis med olika buffertlösningar. I litteraturen anges kalciumkarbonat, natriumvätekarbonat (bikarbonat), natriumkarbonat och natriumhydroxid (Yang, 2012). Att tänka på är bl.a. homogen tillsats och fördelning in situ, kalciumkarbonats låga löslighet, att vätekarbonaten och natriumhydroxiden bildar koldioxid i sura akvifärer (kan blockera porer), samt att natriumhydroxid är en mycket stark bas (pH får inte överskrida optimalt intervall för mikroorganismerna). Vätekarbonat är en vanligt använd buffert i bl.a. kloretrade kolväteförorenade akvifärer. Tester av Delgado *et al.* (2012) tyder på att sådan tillsats i viss mån kan hämma den mikrobiella dekloreringen, men detta kan motverkas genom kompletterande tillsats av HEPES-buffert. I Alingsåsprojektet (Branzén och Ländell, 2017) användes natriumvätekarbonat vid bioaugmentationen. Den var mest lämpad för den bakteriekultur (KB-1) som samtidigt tillsattes. Robinson och Barry (2009) ger information om datorprogram för beräkning av platsspecifikt lämpliga mängder av olika buffertlösningar.

2.3 Oxidativ nedbrytning

Vid sanering av akvifärer som är förorenade med klorerade lösningsmedel och som åtgärdas med mikrobiella metoder, fokuseras alltså till största delen på reduktiv deklorering. Detta gäller oavsett klorerad alifat. Ett miljömässigt viktigt alternativ eller komplement, som börjat få betydelse internationellt, är mikrobiell oxidativ nedbrytning av lågklorerade alifater. För kloretrade etener gäller detta framför allt av VC och i viss mån DCE.

Mikrobiell oxidativ nedbrytning av dessa lågklorerade alifater kräver helt andra förutsättningar än mikrobiell reduktiv deklorering. Vid reduktiv deklorering agerar de klorerade alifaterna som elektronacceptorer medan väte är den dominerande elektronendonatorn. Vid oxidativ nedbrytning däremot så agerar de klorerade kolvätena istället som elektronodonatorer, medan vanliga geochemiska ämnen/föreningar (t.ex. syre, nitrat, Fe^{3+} , etc.) agerar som elektronacceptorer. I motsats till reduktiv deklorering sker inte någon stegvis deklorering till mindre klorerade alifater vid oxidationen. Istället oxideras molekylerna direkt till koldioxid, vatten och klorid. Detta kan ge mikrobiell oxidativ nedbrytning stora fördelar, dels genom att av oxidation av DCE inte bildar VC, dels att oxidation av VC inte kräver så extrema förhållanden som vid reduktiv deklorering (det senare kräver bl.a. mycket lågt redox, väte och *Dhc* med speciella gener).

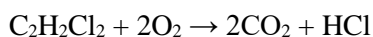
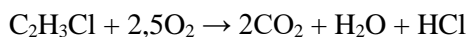
Liksom vid mikrobiell reduktiv deklorering kan den mikrobiella oxidativa nedbrytningen ske metaboliskt eller cometaboliskt. Men den oxidativa nedbrytningen utförs av andra mikroorganismer med helt andra enzym, jämfört med vid reduktiv deklorering. Som nämnts tidigare går metabol nedbrytning vanligtvis avsevärt snabbare än cometabol nedbrytning (oavsett om den är reduktiv eller oxidativ). För cometabol oxidativ nedbrytning gäller att sådan process går snabbare ju högre redox är. För cometabol reduktiv deklorering gäller att denna process går snabbare ju lägre redox är. Vid optimala redox går den cometabola oxidativa nedbrytningen vanligtvis betydligt snabbare än optimal cometabol reduktiv deklorering. För sanering med mikrobiell reduktiv deklorering så är den metabola dekloreringen egentligen det enda relevanta alternativet. Men för sanering med oxidativ nedbrytning kan både metabol och cometabol oxidation ha betydande effekt, framför allt på lågklorerade etener som VC. Metabol och cometabol oxidation beskrivs i separata avsnitt nedan.

2.3.1 Metabol oxidation

En stor fördel med metabol oxidation, jämfört med cometabol oxidation, är att reaktionerna kan gå avsevärt snabbare. En annan fördel är att metabol oxidation kan ske vid betydligt lägre syre-

halter, jämfört med cometabola oxidation. Dessutom verkar de produkter som bildas vid metabol oxidation av klorerade etener vara mindre toxiska för enzymen än produkter från cometabola oxidationer. Metabol oxidation kan inte utföras på PCE och i princip inte heller på TCE, däremot på VC och *cis*-DCE (Bradley, 2003; Jennings *et al.*, 2013).

Reaktionsformler för mikrobiell oxidation av VC och *cis*-DCE kan beskrivas enligt följande (Bradley, 2012):



Områden som ursprungligen blivit förorenade med PCE eller TCE innehåller ofta VC och/eller *cis*-DCE i yttre, nedre horisontella, delen av en kloretenplym. Man har tidigare ansett att dessa plymområden har haft alltför lågt redox för att någon metabol oxidation av dessa lågklorerade etener ska kunna ske. Emellertid har man nyligen upptäckt att VC och *cis*-DCE kan oxideras metaboliskt vid de måttligt låga redox som brukar råda i dessa plymområden. År 2011 utkom två rapporter som klargjorde att man funnit signifikant metabol oxidativ nedbrytning av VC (och i viss mån av *cis*-DCE) under förhållanden där syrehalten var låg-mycket låg (Bradley, 2011; Bradley och Chapelle, 2011). Enligt dessa referenser har mikrobiell metabol oxidation av *cis*-DCE i vatten erhållits med så låga syrehalter som ned till ca 0,1 mg/l, samt att VC har kunnat mikrobiellt oxideras vid ännu lägre syrehalter, ned till 0,01 mg/l.

Metabol oxidation av klorerade etener fungerar alltså i princip endast för *cis*-DCE och VC där nedbrytning av VC kan ske vid lägre redox, jämfört med *cis*-DCE. Detta innebär att reduktivt bildat toxiskt VC i en plym kan ha små möjligheter att fortsätta sin transport nedströms, eftersom VC vid relativt låga redox kan oxideras till koldioxid, vatten och klorid. Detta kan i sin tur minska den toxiska riskbilden nedströms ett utsläpp av klorerade lösningsmedel. Detta öppnar möjligheter för att betydande mikrobiell metabol oxidation av framför allt VC, men även av *cis*-DCE, i realiteten sker i yttre delarna av kloretenförorenade plymer, där låga syrehalter i grundvattnet kan föreligga (Himmelheber och Huges, 2014; Coleman *et al.*, 2002).

Det finns avsevärt större variation av genetiskt kartlagda bakteriesläkten som kan metaboliskt oxidera VC, jämfört med *cis*-DCE. Det finns idag endast en känd (genetiskt kartlagd) bakterie som kan metaboliskt oxidera *cis*-DCE. Bakterien, som är en stam i släktet *Polaromonas*, har fått namnet *Polaromonas* sp. strain JS666 (nedan kallad strain JS666). Denna bakterie upptäcktes i början av 2000-talet i Tyskland i ett system med aktivt kol för rening av vatten som innehöll klorerade etener. Genetisk detektering och kvantifiering av bakterien erbjuds nu kommersiellt. Strain JS666 synes endast kunna nyttja *cis*-DCE metaboliskt (eventuellt även 1,2-DCA men i så fall endast vid låga DCA-halter) (Jennings *et al.*, 2013; Mars och Lieten, 2011; Mattes *et al.*, 2008; CityChlor, 2013).

Det enzymssystem som initierar oxidationen av *cis*-DCE i strain JS666 är cytochrom P450 monooxygenas. För strain JS666 kallas det för *c*DCE monooxygenas. Enzymsystemet P450 finns i många olika organismer vilket gör det omöjligt att enbart koppla det till strain JS666. Emellertid kan vissa genetiska delar av det genkomplex som krävs för produktion av det stora enzymkomplexet P450 kopplas till enbart strain JS666 och dess metabola oxidation av *cis*-DCE. Det kan öppna framtida möjligheter för kommersiell detektering och analys av den mikrobiella potentialen (DNA) eller reella aktiviteten (RNA) för oxidativ nedbrytning av *cis*-DCE i kloretenförorenade akvifärer via P450.

Om enbart motsvarande mikrobiella potential önskas så bör det räcka att analysera gener specifika för själva bakterien strain JS666 (dvs. 16S rRNA) eftersom alla hittills detekterade strain JS66 har visat sig ha potential för nämnda oxidation (Nishino *et al.*, 2013).

Det kan noteras att enligt samma referens (Nishino *et al.*, 2013) så har man visat att det reaktionssätt som strain JS666 använder för oxidation av *cis*-DCE innebär att bildandet av toxisk/reaktiv DCE-epoxid minimeras (exempel på epoxid ges i Figur 2.2). Det är oklart om också metabola VC-oxiderande mikroorganismer använder samma/likartad reaktionsprincip. Om så är fallet så kan det vara en viktig orsak till att bildade produkter vid metabol oxidation av VC och *cis*-DCE verkar vara mindre toxiska för enzymen än produkter från motsvarande cometabola oxidationer.

Internationella kommersiella laboratorier erbjuder nu analys och kvantifiering av strain JS666 i vatten- och jordprov. Därtill är bakterien numera kommersiellt tillgänglig (brukar då kallas JS666) för oxidativ bioaugmentering i akviferer förorenade med *cis*-DCE.

Strain JS666 är speciell i och med att den kan bryta ned *cis*-DCE på två olika sätt. Den använder dels det vanliga sättet med någon typ av oxygenasenzym. Dessutom verkar den kunna bryta ned *cis*-DCE med ett ovanligt reaktionssätt som kallas konjugation (skiljt från både oxidation och reduktion) med enzym som ingår i gruppen glutationsenzym (GSH). Det sistnämnda anses unikt vad gäller kloreter.

Möjligheterna för strain JS666 att metaboliskt oxidera *cis*-DCE är begränsade, både vid höga och låga redox. Dess möjligheter ökar vid ökade halter av löst syre över ovan nämnda syrehaltgräns (ca 0,1 mg O₂/l) upp till en viss syrehaltnivå, varöver förmågan åter minskar. Därtill verkar halter av *cis*-DCE över 1 millimolar (ca 100 mg/l) vara metaboliskt toxiska för strain JS666. Den kan inte metabolisera *cis*-DCE vid pH <6,5 och den slutar att växa vid temperaturer över 30 °C (Jennings *et al.*, 2013).

I motsats till den unika bakterien (JS666), kopplad till oxidation av *cis*-DCE under någorlunda syrefattiga förhållanden, finns en betydligt större variation av kända bakterier som kan oxidera VC under sådana förhållanden. De har detekterats i både förorenade och icke-förorenade områden. Exempel på olika mikroorganismer som metabolt oxiderar VC är *Mycobacterium aurum* (bl.a. strain L1, strain JS60 och strain JS617), *Pseudomonas aeruginosa* strain MF1 och *Nocardioides* sp. (bl.a. strain JS614) (Bradley, 2003; Jin och Mattes, 2011). Vanligtvis använder dessa organismer monooxygenasenzym framför allt för metabol oxidation av eten. Några av de genskvenser som kan kopplas till dessa metabola enzym är idag kartlagda och analyseras av kommersiella internationella analyslaboratorier. Dessa analyser riktar in sig på gener, som kodar för produktion av viktiga enzymdelar, kallade *etnE* (epoxyalkane: coenzyme M transferase (EaCoMT) subunit *etnE*) och *etnC* (alkene monooxygenase (AkMO) alpha subunit gene *etnC*) (Jin och Mattes, 2011; MI, 2015).

Genen *etnE* är kopplad till produktion av en del av det nämnda enzymet. Denna del av enzymet har viktig betydelse för oxidation av VC direkt till koldioxid och klorid. Genen *etnC* är på motsvarande sätt kopplad till oxidation av både VC direkt till koldioxid och klorid och av eten till koldioxid (CityChlor, 2013). Dessa två genskvenser har idag blivit viktiga biomarkörer för metabol VC-oxidation (CityChlor, 2013).

Observera att enzymens oxidation av VC sker metabolisk främst i frånvaro av eten. Om eten föreligger så föredrar mikroorganismerna eten varvid VC primärt bryts ned cometaboliskt med dessa enzym (Jin och Mattes, 2011).

I Tabell 2.5 ges en enkel sammanfattning av möjlig oxidativ metabol nedbrytning av klorerade etener och 1,2-DCA.

Tabell 2.5 Metabol/respiratorisk oxidation av några klorerade lösningsmedel.

Metabolisk oxidation	PCE	TCE	trans-DCE	cis-DCE	VC	1,2-DCA
Aerob	Nej	Nej	Nej	Ja 4/, 6/	Ja 2/, 5/	Ja 1/
Microaerob 3/	Nej	Nej	Nej	Ja 4/, 6/	Ja 2/, 5/	?
Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

1/ I begränsad utsträckning (Jennings et al., 2013).

2/ Oxideras av flertal olika bakteriesläkten med olika oxygenas enzym.

3/ Järnreducerande förhållanden, dock minimum 0,03 mg O₂/l.

4/ Endast en mikroorganism detekterad som metaboliskt oxiderar cis-DCE: *Polaromonas sp. strain JS666*

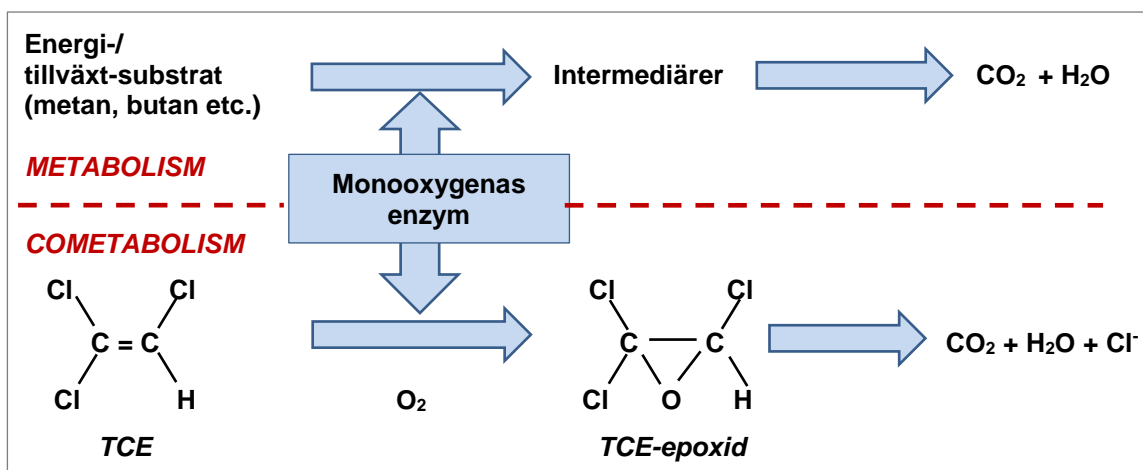
5/ Då enzymet är av typen etenoxygenas så oxideras VC metaboliskt endast vid låga halter av, eller främst vid frånvaro av, eten (Jennings et al., 2013). I annat fall (signifikanta halter av eten) oxideras VC cometaboliskt (Jin och Mattes, 2011).

6/ Optimalt vid en syrehalt som motsvarar partialtrycket 0,21 atm eller något lägre. Oxidationen blir sämre ju högre och lägre syrehalten är i förhållande till optimala halten. Därtill finns restriktioner vad gäller halt av cis-DCE, pH och temperatur, se text.

2.3.2 Cometabol oxidation

I motsats till metabol oxidation av en förening kräver cometabol oxidation att det samtidigt finns andra föreningar/substrat som kan oxideras metaboliskt. Exempel på substrat för cometabol oxidation av klorerade alifater är oklorerade kolväten som t.ex. metan, toluen, fenol, eten, propan, etan. När mikroorganismerna utför denna metabola oxidation, samtidigt med närvaro av klorerad alifat, kan denna cometaboliskt oxideras ”av bara farten”. Principen är densamma för cometabol reaktiv deklorering med skillnaden att den metabola reaktionen är oxidativ. Mikroorganismerna vinner inget med cometabol nedbrytning, i motsats till den parallellt utförda metabola oxidationen (av t.ex. metan) som ger organismerna energi och atomer/molekyler för celluppbyggnad.

I Figur 2.2 ges en konceptuell bild av vad som reaktionsmässigt sker när klorerade etener, exemplifierat med TCE, oxideras cometaboliskt, samtidigt som något substrat, t.ex. fenol, oxideras (i figuren av monoxygenas enzym).



Figur 2.2 Konceptuell beskrivning av cometabol oxidativ nedbrytning av TCE, orsakad av parallell oxidativ metabol nedbrytning av kolkälla med mikrobiella monoxygenas enzym. Modifierad från Semprini (2013).

När fenol metaboliseras bildas vanligtvis först katekol, med efterföljande ringöppning, samtidigt som TCE kan attackeras cometaboliskt. Detta resulterar i att varken DCE eller VC bildas, vilket är fördelaktigt. Istället bildas toxisk TCE-epoxid som cometabol mellanprodukt. En av flera produkter som vanligtvis bildas av TCE-epoxiden är diklorättiksyra som relativt långsamt bryts ned till koldioxid, vatten och klorid.

Epoxider är mycket reaktiva (s.k. fria radikaler) vilket innebär att de vanligtvis endast existerar under kort tid (sekunder – timmar). De kan ändå hinna med att inhibera bakteriernas enzym. Om halten av epoxid är hög kan det resultera i att den sammantagna enzymatiska aktiviteten fullständigt avstannar (Zhang och Tay, 2015).

Antalet klorerade kolvätemolekyler som oxideras cometaboliskt per tidsenhet är avsevärt färre än de substratmolekyler som samtidigt oxideras metaboliskt. Härav tar cometabol oxidation av en viss molmängd av klorerad förening vanligtvis avsevärt längre tid än den samtidiga metabola oxidationen av samma molmängd av substratet. Därtill kan substrattillsats, och samtidigt upprätthållande av tillräckligt högt redox, behövas under veckor innan cometabol oxidation kommer igång i någon betydande utsträckning.

Man har funnit att naturligt förekommande mikrobiella samhällen innehåller relativt stor variation av enzym som kan cometaboliskt oxidera kloreter. Exempel på sådana enzymer är alkenmonooxygenas, fenolhydrolas, metanmonooxygenas (MMO), ammoniakmonooxygenas, toluenmonooxygenas (TMO) och toluendioxygenas (Li *et al.*, 2014; Zhang och Tay, 2015).

PCE kan inte oxideras cometaboliskt. Däremot kan TCE, liksom DCE och VC, oxideras cometaboliskt och hastigheten ökar i princip med ökat redox och minskat antal klor på molekyl. Exempelvis, effektiviteten hos metan-metaboliserande bakterier (som innehåller enzymet MMO) att cometaboliskt oxidera klorerade etener är störst för VC och därefter i fallande skala VC > *trans*-DCE > *cis*-DCE > TCE. Oxidationen av TCE är betydligt mindre effektiv än den av VC. Om bakterier som har toluenmonooxygenas (TMO) istället används (med tillsats av fenol eller toluen som metabol kolkälla) kan effektiviteten höjas för alla klorerade etener och effektiviteten är då vanligtvis större på *cis*-DCE jämfört med på *trans*-DCE.

Ett flertal mikrobiella gener har påvisats ha koppling till olika oxiderande enzym. Ett mindre antal har identifierats att även kunna stödja cometabol oxidation av klorerade etener. Kommerciellt erbjuds idag analys av en del av dessa gener och motsvarande mikroorganismer. Exempel på organismer och gener som kodar för produktion av enzym med koppling till cometabol nedbrytning av bl.a. TCE ges i MI (2015b; 2015).

Nyttjandet av cometabol oxidation av klorerade etener som saneringsmetod i fullskala är relativt sällsynt (jämfört med reaktiv deklorering). Detta beror bl.a. på bildandet av mellanprodukter som är toxiska för mikroorganismerna och deras enzym, samt på behovet av substrat. Eftersom man med cometabol oxidation av klorerad eten avser att nyttja mikroorganismens oxiderande enzym både genom att metaboliskt oxidera substratet och cometaboliskt oxidera den klorerade etenen, kan konkurrensen om samma enzym förhindra nedbrytningen generellt. Förutom att substratet kan blockera enzymet för cometabol nedbrytning så kan alltså cometabola produkter, speciellt epoxider (t.ex. TCE-epoxid), inhibera och till och med förstöra enzymet.

Det finns dock enzym som relativt väl kan klara av epoxid-attacker. Dessa är framför allt enzym som metaboliskt oxiderar toluen och fenol. Internationellt har visats att måttligt höga halter av TCE kan oxideras cometaboliskt av bakterier som har sådana enzym. Men denna teknik har inte blivit någon succé eftersom det inte anses lämpligt att utföra sanering av en förorening (TCE) genom tillsats av en annan (toluen/fenol).

Om man överväger att använda cometabol oxidation så bör beaktas att relativt mycket substrat (och metabol nedbrytning av detta) kan behövas för att den cometabola nedbrytningen ska bli

signifikant. Detta gäller speciellt då halter av klorerade etener är måttliga – höga. Man kan då få kloggning/igentäppning i injektionspunkterna, i grundvattenrören samt i transportvägarna (för bl.a. substratet) i akvifären; på grund av att tillsatt substrat får bakterierna att kraftigt föröka sig. Det leder till försämrade möjligheter att *in situ* distribuera och upprätthålla lämpliga halter av substrat och att tekniskt styra optimal syrehalt, inte minst i inhomogena, lågpermeabla akvifärer.

Om däremot halterna av de klorerade etenerna är låga kan man erhålla ökad cometabol oxidation av dessa. Mindre toxisk belastning (från epoxiderna) på enzymen erhålls, samtidigt som mindre halt/mängd substrat behövs. Det ger i sin tur mindre blockering av enzymen (via den metabola oxidationen av substratet). Därtill minskar potentialen för kloggning. Den totala effektiviteten, räknat som antal cometaboliskt oxiderade molekyler/tidsenhet, blir ändå låg.

Fullskalig biostimulerad cometabol oxidation av klorerade etener bör inte väljas som primär saneringsmetod om det finns bättre alternativ. Reaktionerna går relativt långsamt och substrathalten får inte vara alltför hög (för att motverka besvärande kloggning) men heller inte alltför låg (så att de cometabola reaktionerna sker alltför sällan). Det kan leda till att biokemisk processstyrning behövs, t.ex. med styrda recirkulerande system. Förorenat grundvatten pumpas då upp ovan mark till processtyrda biokemiska vattenfasreaktorer med återcirkulering ned i grundvattnet.

Frasconi *et al.* (2015) ger en översyn av erfarenheterna fram till idag avseende användandet av cometabola reaktioner för oxidativ nedbrytning av klorerade lösningsmedel *in situ*, samt ger förslag till fullskalig design.

Flera av de enzym som oxidativt cometaboliserar klorerade etener, kan även göra så med vissa klorerade etaner. Triklormetan (CF) kan cometaboliskt oxideras av bl.a. metanoxiderande och nitrifierande bakterier (de senare under oxidation av ammoniak). Trikloretan i form av 1,1,1-TCA och 1,1,2-TCA kan oxideras cometaboliskt av enzymet MMO medan 1,1,1,2-TeCA och 1,1,2,2-TeCA kan oxideras cometaboliskt av nitrifierande bakterier. Dock, 1,1,1-TCA synes inte kunna oxideras av TMO.

Både MMO och TMO kan även cometaboliskt oxidera 1,1-DCE, men produkten har hög toxicitet på enzymen. Om 1,1-DCE föreligger samtidigt med 1,1-DCA och/eller 1,1,1-TCA så sker i princip inte någon oxidation av dessa etaner.

Det är sannolikt att den cometaboliskt producerade oxidationsprodukten (epoxid) av 1,1-DCE hämmar oxidation av bl.a. dessa etaner genom att enzymet hämmas/bryts ned av epoxiderna (Semprini, 2013). Vidare, metanoxiderande bakterier (innehar MMO) synes inte kunna effektivt cometaboliskt oxidera TCE, ej heller 1,1-DCE, sannolikt orsakat av att deras nedbrytningsprodukter är toxiska för enzymen.

Liksom för klorerade etener bör fullskalig biostimulerad cometabol oxidation av klorerade etaner inte väljas som primär saneringsmetod, eftersom effektiviteten vanligtvis är låg. Det gäller speciellt vid metabol oxidation av toluen och fenol. Detta kan även gälla för metan men effektiviteten kan i vissa fall höjas med nyttjandet av speciella bakterier. Dessa bakterier är s.k. metanotrofer (metan som substrat). De har speciell förmåga att producera två typer av MMO enzym, pMMO och sMMO. Det förra enzymet är i partikelform och förekommer endast inne i bakteriecellen. Det senare, som bara ett mindre antal arter av metanotrofer kan producera, är i löst form och kan transporteras ut genom cellen. När sMMO agerar cometaboliskt utanför cellen har de bildade epoxiderna mindre toxisk inverkan på hela bakteriecellen, jämfört med de enzym som endast verkar inne i cellen.

I Tabell 2.6 ges en sammanfattning av oxidativ cometabol aerob och anaerob nedbrytning av några klorerade alifatiska föreningar. I Tabell 2.7 ges förklaring till enzymatiska förkortningar i Tabell 2.6. Det ska tilläggas att bakterien *Polaromonas* sp. strain JS666 (som kan metaboliskt

oxidera *cis*-DCE) även kan cometaboliskt oxidera bl.a. TCE, *trans*-DCE och VC och i viss mån 1,2-DCA (Jennings *et al.*, 2013; Mars och Lieten, 2011; Mattes *et al.*, 2008; CityChlor, 2013). Det är ännu inte fullt klarlagt med vilket/vilka enzym som detta utförs. Därför är den inte medtagen i Tabell 2.6.

Tabell 2.6 Exempel på några substrat och mikrobiella enzym som kopplas till cometabol oxidativ, aerob och anaerob, nedbrytning av ett urval av klorerade alifater (US EPA, 2013). Förklaring till förkortningarna ges i Tabell 2.7.

Cometabolt	Substrat	PCE	TCE	<i>c</i> -/ <i>t</i> -DCE	VC	1,1-DCE	1,1,1-; 1,1,2-TCA
Aerobt	metan, metanol, propan, propen	-	MMO, MDH, AIMO, CDO	MMO, MDH, AMO, CDO	MMO, MDH, AMO, CDO	-	MMO
	ammoniak	-	AMO	AMO	AMO	-	-
	toluen, butan, fenol, cumen, limonen, etc.	TXMO 1/, 2/	TMO, TDO, TXMO1/	TMO, TDO, TXMO1/	TMO, TDO, TXMO1/	TMO, TDO	TMO, TDO
Anaerobt	metanol	ADH 2/	ADH	ADH	ADH	-	-

1/ Shim *et al.* (2001). Enzymet TXMO är kopplat till en specifik mikroorganism, se not under Tabell 2.7.

2/ Koppling till cometabol PCE attack är sällsynt och om den sker så sker den mycket långsamt.

Tabell 2.7 Förklaring till enzymförkortningar i Tabell 2.6 samt mikrobiella släkten som kan bilda enzymen (US EPA, 2013). Observera, endast ett urval av släkten anges som har art/stam med potential att utföra någon form av nedbrytning av aktuella föroreningar.

Förkortn.	Enzym	Förkortn.	Enzym	Förkortn.	Enzym	Förkortn.	Enzym
MMO	Metan monooxygenas	AMO	Ammoniak monooxygenas	TMO	Toluen monooxygenas	ADH	Alkohol dehydrogenas
MDH	Metanol dehydrogenas			TDO	Toluen dioxygenas		
AIMO	Alken monooxygenas			TXMO 1/	Toluen-o-xylen monooxygenas		
CDO	Katekol dioxygenas						
Mikroorganismer, exempel:	<i>Methylosinus</i> 2/	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i>		<i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i>		<i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Corynebacterium</i>	

1/ Enzymet oxiderar cometaboliskt kloreter i mikroorganismen *Pseudomonas stutzeri* OX1 (Ryoo *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 2001).

2/ Se även i föregående avsnitt om metabol oxidation av VC där mikroorganismer (stammar i släktena *Mycobacterium*, *Pseudomonas* och *Nocardioides*) anges ha förmågan att med bl.a. alken monooxygenas cometaboliskt kunna attackera VC i närvaro av eten.

3. Mikrobiella metoder i fullskala

3.1 Inledning

Det finns idag ett flertal rapporter och webbsidor på Internet som beskriver olika metoder för åtgärd av plyområden förorenade med klorerade lösningsmedel, exempelvis FRTR (2015), US EPA (2015b), Åtgärdsportalen (2015) och Englov *et al.* (2007). Metoderna kan delas in i fysikaliska, kemiska och biologiska. De biologiska metoderna innefattar främst mikrobiella metoder men även bl.a. fytosanering ingår i det begreppet. De mikrobiella metoderna kan delas in i t.ex. naturliga (av människan opåverkade) och förstärkt naturliga (kallas ibland för stimulerade) dvs. naturliga självreningsprocesser som förstärks/stimuleras genom mänskliga insatser.

Information och vägledning för nyttjande av naturlig mikrobiell självrening av klorerade lösningsmedel ges i t.ex. Törneman *et al.* (2009) och i Larsson (2009). Sådan naturlig självrening har visat sig ta lång eller mycket lång tid (några – många tiotals år, upp till eventuellt något sekel beroende på bl.a. spilld mängd, hydro-/geologiska, kemiska och mikrobiella förhållanden) för att nå fullständig nedbrytning i en omfattning som resulterar i acceptabla sluthalter.

På senare tid har det visats att metoder som istället nyttjar förstärkt naturlig självrening har stor potential för behandling av klorerade lösningsmedel, inte minst av klorerade etener. På så sätt kan uppsatta saneringsmål nås inom kort tid (2-5 år). Detta kräver dock goda kunskaper inom bl.a. mikrobiologi, kemi, hydrogeologi, liksom goda erfarenheter av att med speciella teknikköningar utföra sådan sanering i fullskala, samt kunskaper om det aktuella förorenade området.

Metoden förstärkt naturlig självrening innefattar för klorerade lösningsmedel 1/ stimulerad mikrobiell reduktiv deklorering, 2/ stimulerad mikrobiell oxidation. I båda dessa fall tillsätts någon stimulerande förening, förfarandet kallas biostimulering. 3/ tillsats av speciellt utvalda mikroorganismer kallat bioaugmentation.

Det absolut vanligaste sättet som idag används för att påskynda nedbrytning av klorerade lösningsmedel är mikrobiell reduktiv deklorering. Fullständig mikrobiell deklorering (dvs. att alla kloratomer i de klorerade molekylerna är ersatta med väte genom en mikrobiell process) har numera visat sig vara möjlig i akvifärer med signifikanta volymer av grundvatten som innehåller halter vid, eller nära, maximal löslighet för de flesta klorerade etener (Lyon och Vogel, 2013). Bakterier kan inte bryta ned fri fas men de kan alltså bryta ned föreningar som lösts ut från den fria fasen och därefter föreligger med halter näraföreningens effektiva löslighet. Det indikerar att förstärkt självrening av klorerade lösningsmedel är möjlig även mycket nära fri produktfas.

Som angetts i Kapitel 2 i huvuddokumentet bedöms förstärkta mikrobiella metoder för reduktiv deklorering av klorerade lösningsmedel ur tidsmässig synvinkel inte vara lämpade om det finns betydande hotspot i kontakt med akvifären. Med ”tidsmässig” menas att det kan ta lång tid (tiotals år) för att nå tillfredsställande omfattning av fullständig deklorering av föroreningarna. Bedömning av om metodens saneringstid är acceptabel behöver naturligtvis göras platsspecifikt. I en sådan bedömning ingår även möjliga åtgärdsalternativ för hotspot, bl.a. med syfte att påskynda den totala saneringstiden. Om olika metoder väljs för olika delar av ett förorenat objekt bör dessa väljas så att de samverkar för att minimera den totala saneringstiden.

3.2 Metodalternativ

I det följande beskrivs de två sätt att förbättra/påskynda nedbrytningen av klorerade lösningsmedel som vanligtvis associeras med förstärkt mikrobiell nedbrytning av klorerade lösningsmedel i förorenade akvifärer. Dessa är:

- Biostimulering
- Bioaugmentation

Dessa sätt kan användas i hela den förorenade pplymen. De tillämpas vanligtvis med olika *in situ* tekniker som aktivt injekterar, eller passivt tillför, nedbrytningsstimulerande substanser och lösningar direkt i akvifären. I slutet av kapitlet beskrivs också kortfattat en speciell tillämpning, s.k. biobarriär, som vanligtvis begränsas till akvifärer vid fastighetsgränser eller på andra platser där man vill avbryta spridningen.

Detta kapitel fokuserar på metodalternativ som är kopplade till förstärkt/påskyndad mikrobiell reduktiv deklorering, framför allt metaboliskt baserade. Förstärkt/påskyndad cometabol reduktiv deklorering nyttjas i princip inte som huvudmetod för klorerade etener. Orsaken är främst att reaktionerna går avsevärt långsammare än motsvarande metabola reaktioner men även att metabola reaktioner är lättare att styra och övervaka.

Som beskrivits i föregående kapitel finns alternativa möjligheter att mikrobiellt cometaboliskt attackera klorerade etener oxidativt samt lågklorerade etener metaboliskt oxidativt. Cometabol oxidativ nedbrytning tas inte vidare upp här eftersom metoden/angreppsättet har visat sig ge problem. Orsaken är dels att bildade produkter av föroreningarna kan kraftigt hämma bakterieenzymerna och dels att de metabola aktiviteterna kan orsaka alltför kraftig bakterietillväxt. Sådan tillväxt orsakar ofta igensättning i akvifären, inte minst kring injektionspunkterna.

Mikrobiell oxidativ metabol nedbrytning har goda förutsättningar att utvecklas till ett betydelsefullt metodalternativ för lågklorerade etener. Ny internationell kunskap visar på möjligheter till omfattande mikrobiell metabol oxidation av VC och *cis*-DCE, under förhållanden som tidigare ansågs enbart högst marginellt kunna stödja sådan nedbrytning av dessa föreningar. Detta har nyligen rönt ökat intresse, inte minst att alternativet kan ge mycket fördelaktig riskreducering (inte minst vad gäller minskad spridning av VC). Detta gäller både naturlig mikrobiell och, via biostimulering och/eller bioaugmentation, påskyndad mikrobiell oxidativ nedbrytning. Nyttjandet av förstärkt mikrobiell metabolisk oxidativ nedbrytning av VC och *cis*-DCE i fullskala är i princip i sin linda men bedöms komma att öka, framför allt i de längst nedströms belägna delarna av grundvattenplymen förorenade med lågklorerade etener. Metoden tas inte vidare upp här men eventuellt tekniskt fullskalutförande kan i princip nyttja delar av hur biostimulering och bioaugmentation utförs för reduktiv deklorering, dock med helt andra förutsättningar (oxidativa istället för reduktiva).

3.3 Biostimulering

Biostimulering, kopplad till reduktiv deklorering, innebär att den i akvifären naturliga mikrobiella potentialen för reduktiv deklorering förstärks genom tillsats *in situ* av en eller flera miljövänliga fermenterbara livsmedelsgodkända ämnen/produkter/kolkällor (t.ex. socker/melass/vegetabilisk olja). De mikroorganismer som utför fermentationen är vanligtvis allmänt förekommande i akvifärer och behöver sällan tillsättas. Fermentation av kolkällan genererar det väte som speciella mikroorganismer kräver för den reduktiva dekloreringen.

De mikroorganismer som deklorerar högklorerade etener brukar finnas relativt frekvent i akvifärer och kan lätt växa till i nödvänliga koncentrationer efter en biostimulering. För deklorering av lågklorerade etener (dikloreten → vinylklorid → eten) krävs däremot andra, betydligt mer

sällsynta, mikroorganismer (samt andra kemiska förutsättningar såsom högre vätehalter, lägre redox etc.).

Begreppet biostimulering för mikrobiell deklorering av klorerade lösningsmedel kan även innefatta tillsats av ämnen som rent kemiskt (abiotiskt) bildar väte i vatten samt kombinationer av sådana ämnen och fermenterbara kolkällor. Exempel på sådana kombinerade produkter är emulsioner av kolkälla och nollvärt järn där järnet i vatten bildar väte och järnjoner. Det nollvärda järnet kan därtill själv utföra s.k. abiotisk deklorering (se Avsnitt 4.3.3 i huvuddokumentet).

3.3.1 Fermentation

Fermentation är mikrobiellt baserade anaeroba redoxprocesser. I sådana processer kan väte bildas. Väteproduktionen över tid är beroende av vilken förening som fermenteras, vilka mikroorganismer som är involverade samt vilka produkter som bildas. Dessutom kräver vissa fermentativa reaktioner att bildat väte direkt nyttjas och tas ut ur systemet, i annat fall kan den fermentativa reaktionsprocessen avstanna (Müller, 2001). Vätet kan tas ur systemet genom t.ex. att vissa bakterier nyttjar det för deklorering av klorerade lösningsmedel.

Fermentation kan förenklat delas upp i upp till fyra huvudprocesser beroende på vad som fermenteras. Olika grupper av mikroorganismer deltar i olika steg i fermentationsprocessen. Huvudprocesserna kan delas in enligt följande.

1/ Hydrolysis

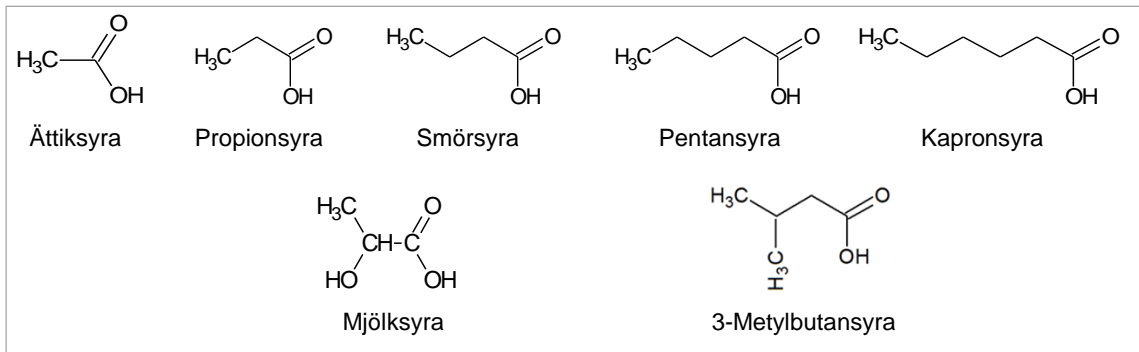
I detta första steg bryts stora molekylläddor (proteiner, fetter, stora kolhydratmolekyler) ned av anaeroba bakterier varvid det bildas enklare, mer lösliga, molekyler (monomerer) i form av fettsyror, aminosyror och enkla sockerarter. Detta sker med hjälp av enzymer som utsöndras av s.k. hydrolytiska mikroorganismer (Nordberg, 2006).

2/ Syrabildning

I syrabildningssteget arbetar acidogena, fermentativa mikroorganismer. De bryter ner de produkter som bildades i det första steget till mindre komplexa ämnen, såsom flyktiga fettsyror (t.ex. ättiksyra, smörsyra, propionsyra, valeriansyra och kapronsyra) och alkoholer. Bland alla de föreningar som kan bildas i detta andra steg är det endast antingen ättiksyra eller vätgas och koldioxid som mikroorganismerna kan omvandla direkt till metan (steg 4 nedan). För övriga föreningar krävs ytterligare omvandlingssteg, bland annat det s.k. ättiksyrabildningssteget (tredje steget), innan potential föreligger att bilda metan (Nordberg, 2006).

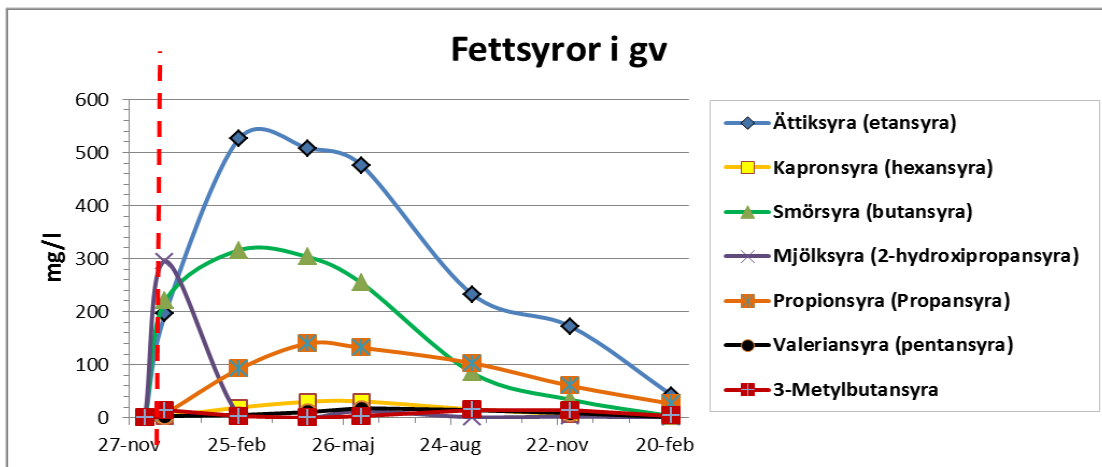
I Figur 3.1 beskrivs molekyllstrukturer hos några av de flyktiga fettsyror (VFA) som laboratorier kan analysera i grundvattenprov.

Generellt anses halter över 10-20 mg/l av någon VFA vara önskvärt för att genom fermentation bilda tillräckligt med väte i ett område som aktivt genomgår mikrobiell reduktiv deklorering av klorerade etener. Enligt US EPA (2015) betraktas halter signifikant över 10 mg/l av propionsyra och smörsyra som fördelaktigt för reduktiv deklorering. Frånvaro av VFA kan indikera behov av att tillsätta fermenterbar kolkälla.



Figur 3.1 Strukturformler för några flyktiga fettsyror (VFA) som kan analyseras av svenska kommersiella laboratorier.

I Figur 3.2 ges exempel på tidsberoende haltutveckling i fält av några fettsyror som kan bildas genom fermentation av tillsatta biostimulerande substrat/kolkällor (i det aktuella fallet bl.a. melass och mjölksyra/laktat). Noteras bör hur snabbt mjölksyran/laktat fermenteras (violett linje i figuren). Detta substrat fermenteras snabbt när det kommer i kontakt med de mikrobiella fermenterarna (mikroorganismer som kan utföra fermentation av lämpliga substrat, t.ex. socker/melass) som förekommer naturligt i marken. Vid fermentationen bildas väte och ju snabbare denna produktion kommer igång, desto snabbare stödjer fermentationen den önskade dekloreringen.



Figur 3.2 Haltutveckling i en grundvattenbrunn av vanliga flyktiga fettsyror (VFA) bildade genom fermentation av bl.a. melass och mjölksyra/laktat som tillförts intill brunnen genom biostimulering. Röd streckad linje: Tid för biostimulering. X-axeln motsvarar tid (Data från Branzén och Ländell, 2017).

3/ Ättiksyrabildning

I detta steg bryter acetogena bakterier ner de flyktiga fettsyrorerna till ättiksyra, vätgas och koldioxid. Detta steg sker bara under lågt tryck av vätgas i processen (Nordberg, 2006). Detta innebär att producerat väte måste förbrukas på något sätt för att processen ska upprätthållas (lågt vätgastryck är en förutsättning). Det kan ske t.ex. genom att vätet nyttjas mikrobiellt för reduktiv deklorering av klorerade föreningar och/eller av metanogena bakterier för produktion av metan (metanogenesis). Mikrobiell reduktiv deklorering och metanogenesis kräver låga – mycket låga redox (beroende på reaktionsprocess) eftersom vanliga geokemiska elektronacceptorer (vanligtvis syre, nitrat, Fe^{3+} , Mn^{4+} , sulfat) i olika grad konkurrerar om att konsumera vätet.

4/ Metanbildning

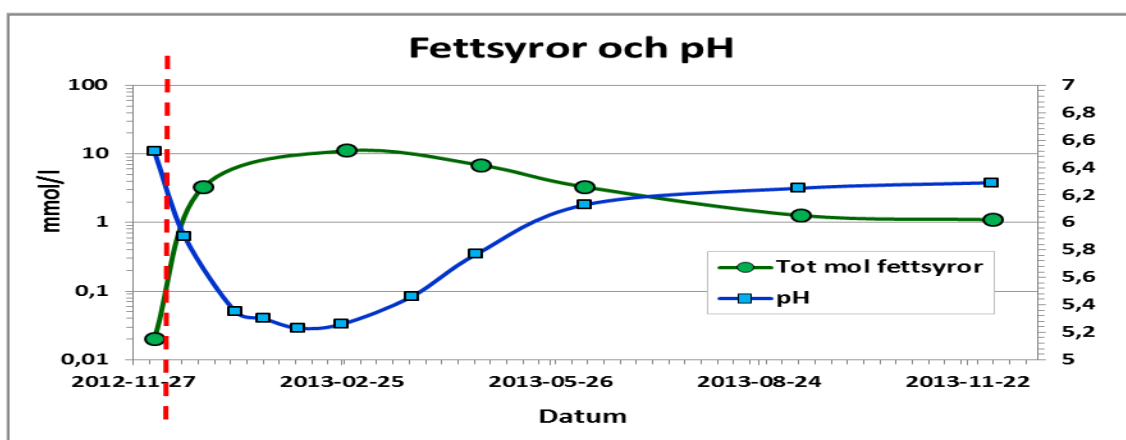
Detta sista steg innefattar metanproduktion. Metanet bildas på två olika, vanligtvis samverkande, sätt av två olika grupper av strikt anaeroba metanogena bakterier (tillhör familjen arkéer). I det första sättet (reaktion A/ nedan) bryts ättiksyran, som bildas från det andra och tredje steget ovan, ned till metan och koldioxid. I denna reaktion sker ca 2/3 av den totala metanproduktionen. I det andra sättet (reaktion B/ nedan), som vanligtvis sker när ättiksyran är förbrukad, omvandlas bildad koldioxid med väte till metan och vatten (Nordberg, 2006). Denna konsumtion av väte konkurrerar med de mikroorganismer som kräver väte för att kunna deklorera de klorerade etenerna.

A/ $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{metanogena bakterier} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ (aceticlastiska metanogener)

B/ $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 + \text{metanogena bakterier} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_4$ (hydrogenotrofa metanogener)

Det första sättet ovan (A/) är inte helt beroende av tillgång på ättiksyra. Processen kan även under vissa förutsättningar ske med andra små organiska molekyler som t.ex. format (myrsyra) och metanol.

Med fermentation och produktion av bl.a. flyktiga fettsyror (VFA) följer att pH sänks i grundvattnet. Detta kan ha avsevärd negativ påverkan på de deklorerande mikroorganismerna, inte minst på *Dhc* som bara kan vara aktiva inom ett begränsat pH-intervall. Optimalt är $6,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$. Behov av att tillsätta buffert kan då föreligga (se nästa avsnitt om pH-buffert). Exempel på hur pH kan förändras, med samtidig förändring av summahalt lösta fettsyror (VFA), ges i Figur 3.3.



Figur 3.3 Tidsberoende förändring av molbaserad totalhalt av analyserade fettsyror (VFA) och pH i prov från ett grundvattenrör intill vilket grundvatten där biostimulering har utförts. Vertikal rödstreckade linje: Tid för biostimulering. (Data från Branzén och Ländell, 2017).

3.3.2 pH-buffert

Som nämnts ovan krävs att pH ligger inom ett snävt intervall för optimal för fullständig mikrobiell reduktiv deklorering av klorerade etener. Akvifären kan redan i undersökningsfasen ha alltför lågt pH eller så kan pH sänkas kraftigt på grund av fermentation av tillsatt kolkälla (pH-sänkande fettsyror bildas) och/eller ökad deklorering (som bildar saltsyra). I de flesta fall krävs tillsats av buffert för att upprätthålla optimalt pH. Exempel på buffert är natriumbikarbonat.

Det finns idag datorprogram som kan beräkna nödvändiga mängder och halter av buffert. Ett sådant program är BUCHLORAC (BUffering of deCHLORinationACidity) (Robinson and Barry, 2009). Beskrivning ges i ESTCP (2010b; 2010c). Programmet, som kan laddas ned kost-

nadsfritt från Internet, är Windowsbaserat och kan skapa en underlagsfil till det geokemiska beräkningsprogrammet PHREEQC (USGS, 2015b). Även detta program kan laddas ned kostnadsfritt (InfoScience, 2015). Med hjälp av dessa program kan man få en bra bild av vilka buffertmängder som krävs vid tillsats av olika kolkällor. Det är också möjligt att göra en geokemisk modellering av dekloreringsprocessen. På webbsidan TBT (2012) finns nedladdningsbara dokument som kan vara till ytterligare stöd vid beräkningar av nödvändig bufferttillsats.

3.3.3 Val av substrat för produktion av elektrondonator

I detta avsnitt ges information om kolkällor/substrat som kan användas för att biostimulera dekloreringsprocessen av klorerade lösningsmedel samt stöd för val av substrat, det senare bl.a. med hjälp av programvara som beräknar mängder och kostnader av enskilda kolkällor, baserat på platsspecifika förhållanden. Substrat, eller kolkälla som det ibland kallas, är någon form av organisk förening som fermenteras när det förts ner i akvifären varvid väte bildas och löser sig i vattnet. Detta väte är en av flera viktiga faktorer med avgörande roll för möjligheterna att reductivt deklorera klorerade lösningsmedel. Därtill ges kort information om nollvärt järn (Fe^0) i kombination med substrat.

Vid val av substrat behöver flera faktorer beaktas t.ex. substratets löslighet, viskositet, livsmedelskvalitet, enhetskostnad, injektionsfrekvens, mängd fermentativt producerad väte/enhet, mängd buffert för att motverka alltför lågt pH, tidigare erfarenheter etc. Typ av substrat, injektionsfrekvens, mängd, halt, bakterier etc. har inte enbart betydelse för den fermentativa produktionen av väte. Fermentationen kan även generera metan och alltför höga metanhalter kan utgöra problem (Kapitel 7 i huvuddokumentet).

Olika substrat kan fermenteras med olika hastigheter, vilket påverkar mängden substrat som behövs och med vilken frekvens det behöver tillsättas i akvifären. Detta styrs också av hur snabbt substratet kan lösa sig i vattnet. Vanligtvis gäller att ju lägre löslighet och ju högre viskositet substratet har, desto långsammare blir fermentationen, men desto mindre frekvent behöver substratet tillsättas.

En följd av långsam fermentation kan vara en större tendens för substratet att sorberas till akvifärmatrisen vilket i sin tur ger svårigheter att distribuera ut det i akvifären. En del substrat med långsamt fermenterbart innehåll brukar därför bestå av emulsioner med ytaktiva ämnen för att underlätta distributionen. Dock kan sådana produkter ibland återgå i sin relativt svårlösliga form bara några dagar efter de injekterats (US EPA, 2013).

En fördel med snabbfermenterande substrat är att de snabbare kan ge tillräckligt höga vätehalter (för dekloreringsfrämst av VC). Det kan göra att åtgärds målen kan nås snabbare, jämfört med långsammare substrat. En annan fördel med snabbfermenterande substrat är att de vanligtvis har högre löslighet. De kan då lättare distribueras i akvifären. En nackdel är att de kräver mer frekvent injektion/tillsättning, dvs. mindre mängder vid flera tillfällen, jämfört med långsamt fermenterande som kan tillsättas med större mängder vid färre tillfällen. Ju mer substrat som tillsätts, desto större potential för ökad bakterietillväxt och alltför mycket tillfört substrat kan leda till igentäppning, s.k. kloggning, av flödesvägar och injektionsrör, negativ pH-sänkning etc. Det kräver mer frekvent kontroll. Det kan ge högre fältkostnader men å andra sidan ges då större utrymme för att justera/systemoptimera substrathalter, volymer och injektionsfrekvens.

Olika substrat kan ge upphov till tidsmässigt varierande metanhalter och vätehalter. Med substrat som fermenteras snabbt följer att metanproduktion kan bli avsevärt kraftigare initialt, jämfört med substrat som fermenteras mer långsamt. Substrat som fermenteras relativt långsamt orsakar dock inte *a priori* lägre halter metan. Det kan ta längre tid innan de högsta metanhalterna uppkommer, jämfört med snabbfermenterade substrat, och halterna kan då i vissa fall till och med bli högre än för snabbfermenterade substrat. Det kan exempelvis bero på att snabbfermen-

terade substrat tillsatts i mindre mängder/per injektionstillfälle, jämfört med långsamt fermenterade substrat.

Om man utgår från en bestämd molmängd av kolkälla så kommer snabbfermenterade kolkällor att generera mer väte per tidsenhet än långsamt fermenterade. De förra tar dock alltså slut fortare vilket innebär att man kan behöva tillsätta oftare och i mindre mängd per gång av de snabbfermenterade kolkällorna, jämfört med de långsammare. Det finns ett optimalt haltintervall av väte för varje dekloreringssteg. Som anges i föregående kapitel, Tabell 2,4, anses övre gränsen för optimal, fullständig, deklorerings av klorerade etener ligga vid 24 nanomol löst väte/liter vatten.

Inför val av substrat och beräkning av platsspecifikt mängdbehov kan stöd fås av beräkningsprogram. Exempel på sådana är ”Substrate Design Tool” och ”Emulsion Substrate Tool”, som båda finns tillgängliga kostnadsfritt på Internet. Det senare är mer fokuserat på emulserade oljor. Båda är excelbaserade beräkningsverktyg. Beräkningsprogrammen med manual kan kostnadsfritt laddas ned från US EPA/US DOE (SERDP/ESTCP, 2015 resp. SERDP/ESTCP, 2013). Ytterligare information kan fås i ESTCP (2010c). Kompletterande generell information om långsamma kolkällor ges i AFCEE (2007).

I Tabell 3.1 listas de biostimulerande ämnen/substrat/kolkällor som idag vanligtvis används internationellt för att påskynda reduktiv deklorerings. I tabellen ges främst substrat som biotiskt (via fermentation) bildar nödvändigt väte. I tabellen ges också kombinationer av substrat och nollvärt järn som genererar vätet både biologiskt (biotiskt) och kemiskt (abiotiskt). I Simon (2015) och Bardos *et al.* (2015) ges exempel på namn på kommersiella produkter som kombinerar biotisk – abiotisk stimulering. I nämnda tabell ges därtill bl.a. indikativa priser för ett antal olika substrat och bedömning av hur länge de bedöms kunna ge, via sin fermentering, nödvändigt väte till den reduktiva deklorerings.

Med koppling till Tabell 3.1 kan tilläggas att det idag finns nya kommersiella produkter innehållande bl.a. organismer som kan minska problemet med metanproduktion (problem med metan, se avsnitt 7.5 i huvuddokumentet) i bl.a. grundvatten, utan till synes någon hämning av de mikroorganismer som utför deklorerings av kloreter (Mueller *et al.*, 2014).

I Figur 4.2 i huvuddokumentet beskrivs hur nollvärt järn (Fe^0) kan generera väte i vatten varvid järnet övergår till Fe^{2+} . Detta väte kan sedan nyttjas av mikroorganismer för att deklorera klorerade etener. Därtill framgår av nämnda figur, samt i dess efterföljare Figur 4.3, att Fe^0 och Fe^{2+} kan generera abiotisk deklorerings och att reduktion av Fe^{3+} med väte kan ge Fe^{2+} . Denna reduktion undandrar dock vätets möjlighet att alternativt nyttjats vid eventuell mikrobiell deklorerings.

I Alingsåsprojektet (Branzén och Ländell, 2017) användes bl.a. EHCTM (Adventus Inc.), bestående av finkornigt Fe^0 och kolkälla/substrat (Tabell 3.1). Dess huvudsakliga uppgift var att relativt snabbt sänka redox i det vatten som sedermera nyttjades för att tillreda rätt koncentrationer av vätskeblandningar som skulle injekteras *in situ*. Kostnaden var (år 2012) ca 130 SEK/kg EHCTM, jämfört med ca 30 SEK/kg för alternativa substratet melass. Eftersom EHCTM är en blandning av Fe^0 och kolkälla kan man förmoda att enbart nollvärt järn kostar minst lika mycket per kg som EHCTM. Vidare kan, teoretiskt sett, 1 gram Fe^0 generera 0,036 gram H_2 . I ovan nämnda excelbaserade beräkningsprogram för substratbehov fås att lättlöslig melass vid fullständig fermentation kan ge 0,024-0,045 gram H_2 /gram melass (variationen beror bl.a. på andelen fruktos). Det indikerar att Fe^0 och lättlösliga fermenterande substrat har ungefär samma vätebildande potential, varvid järnet då får en kostnadsnackdel. En annan nackdel med järnet är att man i samband med injektion *in situ* kan få sämre spridning i jordmatrisen, jämfört med lättlösliga substrat, vilket kan leda till en mer begränsad kontakt mellan järnet och förorening. Emellertid, nollvärt järn kan eventuellt ge en snabbare, och *on site* enklare, redoxsänkning än fermenterbara substrat, vilket är en fördel vid sänkning av redox i vatten som används för tillredning av vätskor som ska injekteras.

Tabell 3.1 Information om substrat för fullskalig biostimulering genom reduktiv deklorering av klorerade lösningsmedel (ESTCP, 2010c; AFCEE, 2004; Keijzer *et al.*, 2012; US EPA, 2015).

Substrat	Enhetspris, SEK/kg	Form / målhalt 5/	Livs-längd	Internationell erfarenhet	Kommentar övrigt
Substrat med högre löslighet 2/					
Metanol	1	Lösning/ 50-300	Dagar	Moderat	Höga halter är mikrobiellt toxiska. Injekterad lösning utspädd till 3-30 vikt-%.
Etanol	< 5	Lösning/ 50-300	Dagar	Moderat	Höga halter är mikrobiellt toxiska. Injekterad lösning utspädd till 3-30 vikt-%.
Na-/K-laktat	20-50	Lösning/ 50-300	Veckor	Moderat	Erfarenhet hög vid bioaug med <i>Dhc</i> . Injekterad lösning utspädd till 3-30 vikt-%.
Propionat, butyrat	40-60	Lösning/ 50-300	Veckor	Låg	Liten erfarenhet. Även fermentationsprodukt. Injekterad lösning utspädd till 3-30 vikt-%.
Vassle	1	Lösning/ 50-500	Månader	Låg	Billig avfallsprodukt. Alt 1: Puder: Löses i vatten: Alt 2: Färsk vassle: Viskös vätska, egenskaper som emulsioner och oljor.
Melass / Prot-amyllass 1/	5-10	Lösning/ 50-500	Veckor	Hög	Innehåller näringsämnen. I vissa produkter kan finnas metaller eller växtbekämpningsmedel. Injekterad lösning utspädd till 1-10 vikt-%.
Sirap	5-10	Lösning/ 50-500	Veckor	Moderat	Glukos-/majssirap (hög frukthalt) etc. Injekterad lösning utspädd till 1-10 vikt-%.
Substrat med lägre löslighet 3/					
3DMe	> 100	Slurry / 100-500	2-3 år	Hög	Vätska, låg viskositet, komplex mix av bl.a. mjölksyra, polylaktat och fettsyror esterifierade till en kolbaserad molekyllämplig av glycerin.
HRC®-produkter	> 100	Slurry / 100-500	0,7-4 år	Hög	Slurry eller fast produkt (6-18 kg/vertikal m). Effekt HRC® 9-18 mån., HRC-X® 3-4 år. Tryckbegränsat i djup, alt. spec. prep. (uppvärmning, tryckinjektering med glycerin etc.)
Emulsi-fierade oljor 4/	40-60	Slurry / 100-500	2-3 år	Moderat – Hög	T.ex. Newman Zone®. Emulsion underlättar spridning. Höga substrathalter kan minska hydr. kond. => spåda => kortare livslängd. % vätska i slurry produktspecifikt samt funktion av % emulgering + ytaktivt ämne.
Vegetabila oljor	5-10	Slurry / 100-500	2-3 år	Låg	Svåra att sprida <i>in situ</i> . Injekterad lösning 5-15 vol-% olja i vatten.
Fe ⁰ + organiska substrat	> 50	Slurry / 100-500	0,5-2 år	Moderat	Vanligast är EHC® (finpartiklar i form av integrerade kolfibrer och Fe ⁰ partiklar). Kan användas för bl.a. redoxsänkning.
Olje-emulsion + Fe ⁰	> 100	Slurry / 100-500	0,5-2 år	Moderat	NASA-patent. Fe ⁰ + olja i vatten emulsion. Nollvärda järnet är främst nanojärn.
Humussyror	10-20	Slurry	1-2 år	Låg	Minimalt produktutbud. Halt syror oklar.
Kompost	< 5	Fast / 100-1000	> 5 år	Låg	Kan användas i diken, biobarriärer, återfyllnad efter gräv, yttäckn. Färdig fast mix att tillsätta består av sand med 20-60 vol-% kompost.
Kitin	< 5	Fast / 100-500	1-2 år	Låg	Avfall skaldjursind. Teknik+effektivitet oklar. Pulver+vatten: (viskös) slurry. Ev. hotspot, biobarriär, diken.
Vätgas	15-30 SEK/m ³	Gas	Timmar-dagar	Låg	Teknik+effektivitet oklar. Ev. hotspot, biobarriär, biosparging, membran, recirkulering löst i vatten. Pulserande tillförsel.

1/ Protamyllass biprodukt vid produktion av stärkelse.

2/ För "Substrat med högre löslighet" gäller: Kan användas i alla delar av akvifären, inkl. i källa. Direkt injektering eller i recirkulationsbrunnar. Potentiellt hög mobilitet hos substraten kan tillåta större avstånd mellan injektionspunkter, relativt "Substrat med lägre löslighet". Fettsyror + alkoholerna kan behöva tillsättas kontinuerligt under timmar-dagar.

3/ "Substrat med lägre löslighet" kräver max 1,5-4,5 m mellan injektionspunkterna.

4/ Oljorna är vegetabiliska. Produkterna innehåller enbart oljeemulsioner eller mix med andra substrat, t.ex.: Newman Zone, EOS 598, SRS, Lactoil, CAP-18.

5/ Form: Form som produkten appliceras *in situ*. Målhalt: Halt i milligram/liter som ska uppnås i akvifären. Undantag för "Kompost" där enheten är mg TOC/liter. För "Vätgas" gäller 100 % ren vätgas eller mix med kvävgas. OBS! Hög explosionsrisk med syre.

Det finns olika *in situ* metoder som kan leverera substrat till förorenade akvifärer. Beroende på i vilken form substratet är så kan det tillföras med 1/ sonder som trycks ned i marken, 2/ i permanenta injektionsrör, 3/ i grundvattenrör som används för recirkulation, 4/ via infiltrationssystem eller i 5/ grävda diken eller gropar.

Injektion med sonder ("direct push" med t.ex. Geoprobe®) kan vanligtvis utföras i okonsoliderade jordlager ned till ca 15 m u my och anses mest lämpat för pumpbara substrat som har längre livslängder (slurry, Tabell 3.1). Om injektion av substrat i denna form istället görs i brunnar är det viktigt att brunnarna tätas tillräckligt bra för att motstå metodens applicerade tryck så att substratet endast blir levererat till den eller de nivåer som har valts.

Permanent injektionsrör används för periodisk tillförsel av substrat med kortare livslängder (lösningar, Tabell 3.1) samt då tillförsel skall ske i jordlager, eller på djup, som sondinjektion inte klarar. Injektionsrören kan vara konstruerade enbart för ändamålet (t.ex. vertikala djupa rör i plym eller horisontella rör placerade på lämpligt djup under byggnader) eller tidigare använda kontrollrör eller extraktionsrör. Om substratet tillsätts i dessa rör under tryck så måste rörkonstruktionen vara så robust att den klarar att leverera substratet enbart till förbestämt vertikalt/horisontellt område (dvs. substratet får inte ta annan väg än avsedd). I Tabell 3.2 ges sätt att leverera olika typer av substrat, givna i Tabell 3.1, för biostimulering av mikrobiell deklorering av klorerade alifater.

Tabell 3.2 Olika sätt att leverera substrat för förstärkt mikrobiell nedbrytning av förorening (AFCEE, 2004).

Substrattyp	Källområde	Plym	Biobarriär
Lösningar / Substrat med högre löslighet (t.ex. laktat, melass).	Periodiska injektioner i källan. Vid behov recirkulation i rör placerade över hela källområdet.	Periodiska injektioner i punkter ordnade som rutnät eller som linjer. Vid behov, storskalig recirkulation (extraktion, någon form av behandling ovan mark med efterföljande injektion)	Periodiska injektioner i punkter placerade i en eller flera linjer vinkelräta mot plymriktningen. Placering av linjerna sinsemellan som funktion av bl.a. substratdriften.
Slurry / Substrat med lägre löslighet (t.ex. emulsi-fierade oljor, HRC®).	Enstaka (någon/några), ej frekventa, injektioner i källan (kan vara endast en gång för vegetabiliska oljor)	Enstaka (någon/några), ej frekventa, injektioner i punkter ordnade som rutnät eller som linjer.	Enstaka (någon/några), ej frekventa, injektioner i punkter placerade i en eller flera linjer vinkelräta mot plymriktningen. Placering av linjerna sinsemellan som funktion av bl.a. substratdriften.
Fasta substrat (kompost, kitin).	Tillförsel en gång eller ev ytterligare någon gång (t.ex. placering i källzon efter uppgrävning)	Är inte lämpligt för stora plymer. För övriga plymer: Kan eventuellt finnas potential tillsammans med kombination av både behandling av källa och multipla biobarriärer.	Tillförsel en gång (ev. ytterligare någon gång) i en eller flera linjära diken placerade vinkelrät mot plymriktningen.
Vätgas. Metoden är på experimentstadiet.	Pulserade injektioner i grundvattnet, i form av biosparging.	Kontinuerlig – semikontinuerlig biosparging. Konfiguration av placeringen oklar. Är sannolikt inte lämpligt för större plymer.	Kontinuerlig – semikontinuerlig biosparging i linjer vinkelräta mot plymriktningen

Placering av injektionspunkter eller rör designas så att det injekterade substratet kan spridas i tillfredställande omfattning mellan punkterna. För varje punkt gäller då en viss influensradie (ROI, Radius of Influence). I Tabell 3.3 ges teoretiska exempel på volymer av fullt upplösta substrat som krävs för att nå olika ROI i en akvifär med 30 % porositet och där substratet ska tillföras i olika (vertikala) injektionsintervall.

Tabell 3.3 Exempel på hur olika influensradier vid olika injektionsscenarioer påverkar substratvolymen, nödvändiga för att nå givna radier (AFCEE, 2004).

Influensradie (ROI), meter	Akvifärens effektiva porositet, %	Injektionsintervall, vertikalt, meter	Substratvolym för att nå given ROI, kubikmeter
1,5	25	3	5,3
3	25	3	21,2
7,5	25	3	133
15	25	3	530
15	25	6	1060

Angivna substratvolymen i Tabell 3.3 baseras på de teoretiska influensradier som kan uppnås med vattenlösning av substrat vid den ideala förutsättningen att innehållet i vätskan sprids på ett radiellt enhetligt sätt. Sådana förhållanden är sällsynta. Därmed har beräkning av substratvolymerna inte tagit hänsyn till platsspecifika heterogeniteter i marken som gör att substrathalterna, och därmed också halten av löst väte (fementativt producerad), varierar över akvifärvolymen definierad av aktuellt ROI. Därför brukar beräkningar inkludera säkerhetsfaktorer för detta. Det är inte minst betydelsefullt för lösningar innehållande lättfermenterade substrat (t.ex. laktat, melass) eftersom de kan ha potential att fullständigt fermenteras innan de når yttre delen av ROI. Exempelen i Tabell 3.3 är givna endast för att få en uppfattning av volymer. Därtill kan vertikalt injektionsintervall om 3 m i djupled behöva vara platsspecifikt betydligt kortare.

En betydande aspekt vad gäller stora substratvolymen i Tabell 3.3 är att de kan få delar av den förorenade volymen att undanträngas/spridas till andra områden som ligger i anslutning till injektionsområdet. Det tryck med vilket substratet tillsätts kan här spela en viktig roll. I vissa fall minskar man tillsatt volym men ökar substrathalten och förlitar sig på naturlig advektion (transport med porvattnet/pluggflöde; AU, 2016) och dispersion (transport orsakad bl.a. av variation i hastigheter mellan olika porer; AU, 2016). Även diffusion (spridning orsakad av olika koncentrationsgradienter; AU, 2016) anses kunna spela en viktig roll för spridningen, speciellt i lågpermeabla akvifärer för substrat som har långlivade egenskaper. Sådana substrat har dock lägre löslighet, Tabell 3.1, vilket kan ge långsammare produktion av väte och därmed långsammare nedbrytning av de klorerade etenerna (än de som har högre löslighet, Tabell 3.1). De behöver emellertid inte injekteras så ofta (eftersom de har längre aktiv livslängd). Om substrathalten ökas kan det orsaka lokalt ökad bakteriell tillväxt och igentäppning av flödesvägar. Denna effekt blir större ju mer lättfermenterat substratet är.

Man brukar ibland ange som tumregel att injektion av en volym som är mindre än 10% av den volym av akvifären som ska behandlas, genererar acceptabelt låga undanträngningsvolymen. Men detta kräver att akvifären kan klara av ganska höga naturliga massflöden och spridningar för att substratet ska hinna nå yttre ROI innan det i alltför hög grad har fermenterats (AFCEE, 2004). Det innebär sammantaget att det kan vara svårt att undvika undanträngning med lösningar av enbart lättfermenterade substrat.

En annan viktig aspekt när det gäller stora substratvolymen är att ju större akvifärvolym som ska behandlas, desto större betydelse får val av substrat vad gäller dess kostnad och fältkostnaden för substratets injektion (antal injektioner). Detta kan resultera i att man väljer substrat med lägre löslighet (slurry, Tabell 3.1) och långsammare fermentation, men resultatet kan då bli längre saneringstid. Slurrybaserade substrat har vanligtvis långsammare fermentation och kan då tillsättas med mindre volymer som innehåller högre koncentrationer av fermenterbart material.

Om dessa mindre volymer ska kunna nå samma ROI som större volymer i Tabell 3.3 så krävs att man förlitar sig på att den naturliga advektionen och dispersionen är hög. Detta angreppssätt är mindre lyckat om akvifären är heterogen med möjligheter för substratet att främst transporte-

ras längs enstaka flödesvägar med relativt hög permeabilitet. Det ger dålig homogen naturlig spridning, förutsatt att inte substratet har mycket god förmåga att diffundera.

Otillfredsställande, dålig, spridning kan motverkas genom tätare satta injektionspunkter (men medger ökade kostnader) som följd.

Sammantaget väljs vanligtvis långsamt fermenterande, dyrare, substrat (vanligtvis slurrybase-rade) till lågpermeabla, lågflödesakvifärer medan vattenlösningar av lättfermenterade, billigare, substrat väljs till högpermeabla akvifärer. Det senare kräver mer frekventa injektioner för att upprätthålla tillräckligt omfattande fermentation.

3.3.4 Exempel på kemiskt – mikrobiellt utfall

I Tabell 3.4 och Figur 3.4 ges exempel på fältresultat från analys av grundvattenprov tagna i samma provpunkt dels strax före biostimulering, dels fjorton månader efter biostimulering. Biostimuleringen utfördes i kluster 1-3 m uppströms enskilda provpunkter under några dagar genom injektioner med blandning av Newman Zone® och melass. Prov av grundvattnet togs vid ett flertal tillfällen efter stimuleringen.

Tabell 3.4 Mikrobiell analys av vattenprov tagna i samma provpunkt dels en vecka före biostimulering, dels fjorton månader efter biostimulering (Data från Branzén och Ländell, 2017).

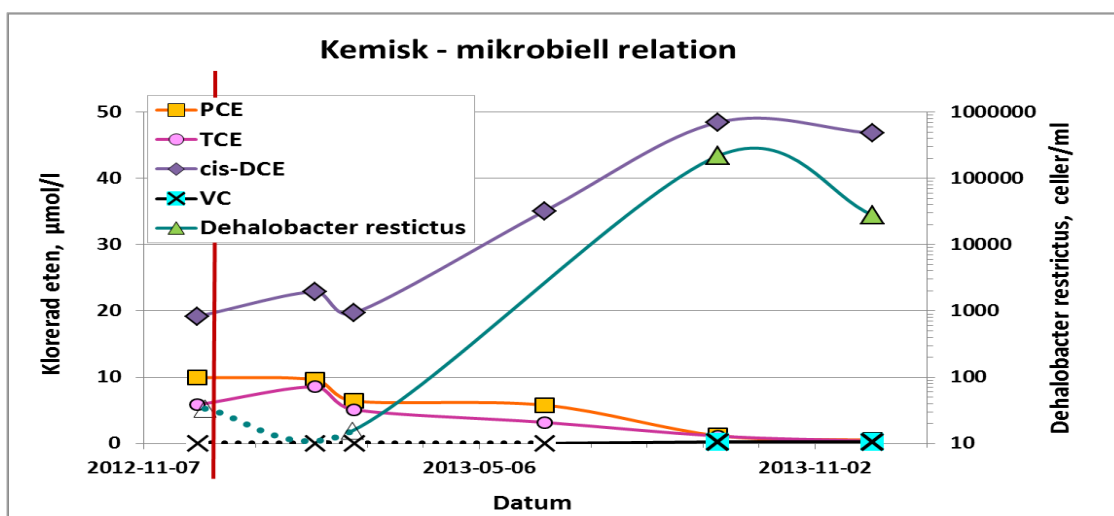
Analys	Enhet	En vecka före biostimulering	Fjorton månader efter biostimulering
KEMISKT			
PCE	µg/l	1650	25
TCE	µg/l	765	25
<i>cis</i> -DCE	µg/l	1860	1860
<i>trans</i> -DCE	µg/l	9	10
VC	µg/l	u.d.	u.d.
Eten	µg/l	u.d.	1
Dekloreringsgrad (DKG)	%	32	50
MIKROBIELLT, detektionsgräns	antal/ml	6,7 • 10¹	3,3 • 10¹
Totala bakterier	celler/ml	5,0 • 10 ⁵	7,5 • 10 ⁶
Järnreducerande bakterier (<i>Geobacter</i> spp.)	celler/ml	1,5 • 10 ⁵	3,6 • 10 ⁵
Dekloreerande bakterier			
<i>Dehalococcoides</i> spp. (<i>Dhc</i>)	celler/ml	u.d.	u.d.
<i>Dehalobacter restrictus</i>	celler/ml	u.d.	3,9 • 10 ⁴
<i>Dehalobacter</i> sp. strain TCA1	celler/ml	u.d.	u.d.
<i>Desulfuromonas</i> spp.	celler/ml	u.d.	u.d.
Funktionella gener			
<i>tceA</i> (TCE reduktiv dehalogenas)	DNA-kopior/ml	u.d.	u.d.
<i>vcrA</i> (VC reduktas) + <i>bvcA</i> (VC reduktas)	DNA-kopior/ml	u.d.	u.d.
<i>dsrA</i> (sulfid reduktas) + <i>dsrB</i> (sulfid reduktas)	DNA-kopior/ml	u.d.	3,2 • 10 ³
<i>mcrA</i> (metyl coenzym M reduktas)	DNA-kopior/ml	u.d.	4,2 • 10 ⁴

u.d. = Under detektionsgräns.

Dekloreringsgraden (DKG; se Kapitel 5 i huvuddokumentet) i exemplifierad punkt var initialt 32 % och hade legat kring detta värde ett flertal år dessförinnan i det närliggande området kring punkten. Före biostimuleringen fanns varken *Dhc* eller funktionella gener som kan kopplas till potential att deklorera klorerade etener i den aktuella punkten. Inte heller fanns fermenterbart substrat.

Fjorton månader efter biostimuleringen var halterna av *Dhc* och de funktionella generna fortfarande under rapporteringsgräns. Däremot uppvisade proverna en tydligt ökad deklorering av både PCE och TCE med början ca 5 månader efter biostimuleringen, vilket indikerar flera månaders lagfastid (tiden för bakteriens fördröjningsfas, dvs. den tid som bakterien behöver för tillväxt och att komma igång med signifikant nedbrytning). Men ingen signifikant deklorering av bildade lågklorerade etener erhöles, vilket resulterande i stalling vid *cis*-DCE (DKG 50 %) under de 15 månaderna fram till bioaugmentation, Figur 3.4 och Figur 3.6

Informationen i Figur 3.4 gäller med start strax före biostimuleringen. De detekterade halterna av PCE, TCE och *cis*-DCE var då ungefär desamma som de varit under ett flertal år före biostimuleringen i närliggande område. Men i och med biostimuleringen skedde en avsevärd ökning av antalet *Dehalobacter restrictus*, samtidigt som dekloreringen av PCE och TCE tog fart. Detta resulterande i markant ökad halt av *cis*-DCE, fram till dess att halterna av PCE och TCE blivit så låga att ytterligare signifikant produktion av *cis*-DCE inte var möjlig. Därefter förändrades inte nämnvärt den relativt höga halten *cis*-DCE. Under hela den tid som enbart innefattade biostimulering var halten VC och halten *Dhc* lägre eller nära rapporteringsgränsen.



Figur 3.4 Relation mellan halter av PCE, TCE och *cis*-DCE samt av *Dehalobacter restrictus* som är känd att deklorera högklorerade etener. Halter av *Dhc* låg under rapporteringsgräns under hela förloppet (redovisas ej i figuren). Röd vertikal linje: Tid för biostimulering. Alla ofyllda punkter motsvarar värden under respektive rapporteringsgräns. (Data från Branzén och Ländell, 2017).

I akvifärer finns normalt stor variation av mikroorganismer som kan utföra reduktiv deklorering av högklorerade etener, bl.a. *Dehalobacter*. Figur 3.4 indikerar att *Dehalobacter restrictus* hade en viktig roll vid produktion av *cis*-DCE. *Dehalobacter* kan dock inte utföra den önskade fortsatta dekloreringen av *cis*-DCE. Det är, som tidigare nämnts, endast vissa stammar av *Dhc* med speciella gener som kan utföra deklorering av *cis*-DCE till VC och vidare till eten. Resultaten visar att dekloreringen avstannade vid *cis*-DCE vilket är typexempel på stalling. Orsaken var sannolikt frånvaro av de speciella stammarna av *Dhc*. Resultaten visar tydligt att behov av en efterföljande bioaugmentation förelåg.

3.4 Bioaugmentation

Bioaugmentation innefattar tillsats av biologiskt aktivt material som kan bryta ned föroreningen. Det består vanligtvis av en utvald högkoncentrerad aktiv naturlig bakteriekultur vars naturliga enzymer kan utföra önskad nedbrytning. Det bioaktiva materialet kan även innefatta i naturen befintliga svampar (fungi) med lämpliga enzymer, eller enbart de naturliga enzymerna som sådana, samt ibland även ämnen som stödjer de enzymatiska aktiviteterna (t.ex. vitamin B12). Därtill tillsätts som regel även någon utvald livsmedelsgodkänd kolkälla/elektronodonator för att generera lämpliga mikrobiella betingelser. Tillsats av kolkälla är i princip en form av biostimulering men vald donator är ofta en annan, och halt och mängd mindre, än vid en gängse biostimulering. Mängden är endast till för att hjälpa de tillsatta mikroorganismerna att komma igång. Dessutom förutsätts att biostimulering utförts tidigare och att det därifrån finns tillräckligt med fermenterbart substrat kvar i akvifären för nödvändig produktion av väte till den fullständiga dekloreringen. I annat fall får man överväga att tillsätta större mängd substrat.

Bioaugmentation utförs för att påskynda den mikrobiella nedbrytningen av förorening. Behovet kan vara orsakat av att föregående biostimulering (Avsnitt 3.3) inte resulterat i tillräckligt höga koncentrationer av mikroorganismer med nödvändiga aktiva gener för den önskade nedbrytningen. Om dessa organismer och gener detekteras före biostimuleringen men i alltför låga halter, samt om det inte finns krav på att uppnå så kort saneringstid som möjligt, kan man vänta 1-3 år med beslut om bioaugmentation. Beslutet baseras då på det mikrobiella utfallet av flera grundvattenprov (eller andra provtagningsätt/medier som avspeglar mikrobiologin i akvifären). Därtill krävs att den utförda biostimuleringen har resulterat i tydlig fermentation, som indikerats med vattenanalys av flyktiga fettsyror (VFA). I annat fall får övervägas att utföra en inledande bioaugmentation med fermentationsbakterier. En samtidig tillsats av deklorerande mikroorganismer kan då med fördel göras.

Om däremot så kort saneringstid som möjligt är avgörande utförs bioaugmentationen i samband med biostimuleringen. Den tillförda produkten av mikroorganismer väljs då med fördel som innehåller ett konsortium av både fermenterande och deklorerande mikroorganismer (i det senare måste ingå bl.a. *Dhc* med aktiva, nödvändiga, gener). Det är även här viktigt att kontrollera att fermentationen kommer igång snabbt.

Vid bioaugmentation för reduktiv deklorering av klorerade alifater tillförs kulturen normalt *in situ*, antingen via injektion direkt i marken/akvifären eller via, i för ändamålet anlagda, rör/brunnar. Mer sällsynt är tillsats *ex situ*, som då utförs i behållare/bioreaktorer kopplade till ett tillslutet (anaerozt) recirkulerande *in situ* system.

3.4.1 Bakteriekulturer

Vid bioaugmentation i kloretenförorenade akvifärer innehåller den tillsatta bakteriekulturen framför allt *Dhc* med aktiva gener som producerar enzym med vilka lågklorerade etener kan dekloreras. Kulturen kan även innehålla andra mikroorganismer som kan deklorera högklorerade etener samt mikroorganismer som kan utföra fermentation av i akvifären befintligt, eller samtidigt tillsatt, substrat. De tillsatta mikroorganismerna skall alltid ha naturligt ursprung. De speciella mikroorganismerna kommer från akvifärer som uppvisat fullständig mikrobiell nedbrytning av föroreningar bestående av likadana molekyler som i det aktuella fallet.

I Tabell 5.1 i huvuddokumentet ges tabellerade haltintervaller av *Dhc*, kopplade till olika bedömningar. Där anges två alternativa haltintervaller av genkopior som båda motsvarar ”Måttlig halt av *Dhc*”, dels $10^4 - 10^6$ genkopior (celler)/liter och dels $10^4 - <10^7$ genkopior (celler)/liter. I litteraturen anges vanligtvis att övre gränsen för denna tolkning är 10^6 genkopior (celler) av *Dhc*/liter. Emellertid har Lu *et al.* (2006) föreslagit $<10^7$ genkopior (celler)/liter som övre gräns för denna tolkning som nu också har anammats av amerikanskt kommersiellt genanalyserande laborato-

rium (MI, 2015f). I samma tabell anges intervall för hög halt av *Dhc*. I litteraturen anges ibland att $>10^6$ celler/liter av *Dhc* krävs för effektiv deklorering av lågklorerade etener. Emellertid, Lu *et al.* (2006) har föreslagit att minst 10^7 celler/l av *Dhc* bör sättas som gräns för att säkerställa fullständig deklorering. Enligt Stroo *et al.* (2013) har denna gräns därefter föreslagits i flertal artiklar. Lu *et al.* (2009) fann att fullständig deklorering till eten endast skedde i ett flertal förorenade akvifärer då halterna av *Dhc* var minst 10^7 celler/l. Denna sistnämnda haltgräns har nu anammats av amerikanskt kommersiellt genanalyserande laboratorium som också anger att halter under 10^7 genkopior (celler)/liter av *Dhc* kan innebära att saneringsmål inte nås inom acceptabel tid (MI, 2015f).

Dessa angivna haltgränser, samt givna haltgränser av *vcrA* + *bvcA* i Tabell 5.2 i huvuddokumentet, kan jämföras med vad som nyligen erfarits i Alingsåsprojektet (Branzén och Ländell, 2017). I de två provpunkter som i Alingsås var påverkade av bioaugmentation, och som resulterade i avsevärd deklorering av lågklorerade etener till eten, detekterades *Dhc* i grundvattenprov, i halter i intervallet $4 \cdot 10^7$ - $3 \cdot 10^8$ celler/liter av *Dhc*. Proverna togs 3-7 månader efter bioaugmentation. Inom detta tidsintervall detekterades i samma grundvattenprov summan av generna *vcrA* + *bvcA* (båda kopplas till VC deklorering, se Tabell 2.3 i Kapitel 2) med halter i intervallet $2 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^8$ genkopior/liter (se Tabell 3.5, Avsnitt 3.4.3). Detta, sammantaget med kemanalyser av ursprungsförorening och förväntat bildade nedbrytningsprodukter, gav en hög sannolikhet att VC mikrobiellt deklorerades.

De mikrobiella halterna i nämnda Alingsåsprojekt baserades på DNA-analyser eftersom transporttiden till internationellt laboratorium inte medgav relevant analys via RNA. Resultaten gav ändå en sammantagen säker indikation på att det förelåg hög mikrobiell potential för önskad fullständig deklorering av de klorerade etenerna. Underlaget kompletterades med isotopanalyser som gav 100 %-iga bevis på vad som indikerats, dvs. att fullständig mikrobiell deklorering skedde samt att den var signifikant.

Kommersiella mikrobiella produkter, avsedda för bioaugmentation, innehåller vanligtvis blandningar av *Dhc* och andra naturliga bakterier som sammantaget är specialiserade på att deklorera klorerade etener, t.ex. KB-1[®] (innehåller främst *Dhc* och *Geobacter*). I en del fall består föroreningsmixen av både klorerade etener och klorerade etaner. I sådana fall räcker det inte med att nyttja bakterieprodukter som fokuserar på endast klorerade etener. Exempelvis, deklorering av 1,1,2-trikloretan (1,1,2-TCA) kräver speciella stammar som kan samspela, såsom dels vissa stammar av *Dehalobacter* (*Dhb*) som dehaloelimineras denna förening till VC och dels vissa stammar av *Dhc* som deklorerar VC till eten. I sådant fall kan produkten KB-1[®] behöva kombineras med annan kommersiell produkt som innehar rätt stam av *Dhb*. Det kan vara betydelsefullt att välja rätt stammar; en del stammar av *Dhb* kan deklorera 1,1,1-TCA till kloretan (CA) medan andra stammar av *Dhb* kan dehaloeliminera 1,1,2-TCA till VC.

Visserligen är det betydligt vanligare att *Dhb* finns i akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel, jämfört med av *Dhc*, men halterna av rätta stammar av *Dhb* är ofta alltför låga, speciellt av den stam av *Dhb* som är bra på att deklorera 1,1,2-TCA. Bioaugmentationen behöver då utföras med blandningar av produkter som resulterar i sammantaget innehåll av nödvändiga stammar av både *Dhb* och *Dhc* (Hug *et al.*, 2013b). Om föroreningen består av kloretener och 1,2-DCA så är dock KB-1[®] tillräcklig (Waller, 2009).

Mikrobiell nedbrytning av både klorerade etener och klorerade etaner kan ibland gå långsamt, fastän man bioaugmenterat med blandningar av kommersiella produkter. Det kan t.ex. bero på att mikroorganismerna i de enskilda produkterna inte samarbetar optimalt när de sammanförs. Det kan också bero på att delar i själva föroreningsmixen hämmar delar av den mikrobiella blandningens nedbrytande aktiviteter. Det är då viktigt att diskutera med leverantörer vilka haltkombinationer av deras olika mikrobiella produkter som ger bäst platsspecifik nedbrytningsseffekt.

Exempel på nämnda hämningar är att reduktiv deklorering av TCE till eten med *Dhc* kan motverkas av höga halter av 1,1,1-TCA. Därtill kan deklorering av 1,1,1-TCA med *Dhb* motverkas av närvaro av klorerade etener. Men med rätt blandning av utvalda mikrobiella produkter så kan de olika mikroorganismerna i blandningen stödja den totala dekloreringen, dvs. om man lyckas att med *Dhc* minska halterna av klorerade etener så minskar det den negativa påverkan på *Dhb* att deklorera 1,1,1-TCA, och vice versa (Hug *et al.*, 2013b).

En betydelsefull parameter i detta sammanhang kan vara innehållet i det biostimulerande, fermenterbara, substratet. Olika kolkällor kan påverka det platsspecifika mikrobiella samhället på olika sätt. Exempelvis föredrar vissa mikroorganismer i produkten KB-1[®] acetat medan *Dhb* i annan produkt kan föredra etanol som kolkälla. Detta kan i sin tur bero på att de olika mikroorganismerna föredrar olika mikrobiella fermenterare och/eller föredrar olika geokemiska miljöer. Därtill föreligger alltid en konkurrens mellan olika deklorerande mikroorganismer om bildat väte (behövs i deras metabola reaktioner).

Det är viktigt att välja rätt platsspecifik kombination av kolkälla och bakteriekultur. Det finns indikation på att fermenterbara kolkällor bestående av emulsioner av oljor kan motverka fullständig deklorering med *Dhc*. McLean *et al.* (2015) fann att biostimulering med sådana kolkällor, med och utan kopplad bioaugmentation med *Dhc*, resulterade i stallning vid *cis*-DCE och VC, i motsats till biostimulering med andra kolkällor.

Man kan från leverantören av bakterieprodukter erhålla information om platsspecifikt lämpliga slutkoncentrationer av både bakteriekulturen och substratet. Biostimulering och bioaugmentation orsakar ökad koncentration av bakterier i akvifären (biostimuleringen främst via naturlig ökning av fermenterande mikroorganismer). Det finns alltid en platsspecifik mikrobiell haltgräns över vilken den bakteriella tillväxten i akvifären blir så stor att grundvattenrör och porerna i akvifären intill injektionspunkterna sätter igen. Detta kan resultera i att saneringseffektiviteten minskar (ger bl.a. minskad permeabilitet med minskad tillgång på förorening och, via fermentationen producerat, väte för de deklorerande mikroorganismerna).

Leverantörer av bakterieprodukter bör inför bioaugmentationen även rådfrågas om vilken slutlig total bakteriehalt av produkten som maximalt bör genereras i akvifären utan att orsaka signifikant kloggning. Inför sådan förfrågan kan det vara bra att nyligen ha analyserat akvifärprover på totalt bakterieinnehåll. Det kan lämpligen göras samtidigt som proven analyseras vad gäller deklorerande bakterier och deras gener. Information om totala bakterieinnehållet brukar då erhållas kostnadsfritt.

3.4.2 Strategi vid injektion av bakteriekultur

Som nämnts ovan krävs olika mikroorganismer för att deklorera olika steg i nedbrytningsprocessen, inte minst vad gäller klorerade etener. Bioaugmentation med *Dhc* och med bakterier som endast deklorerar högklorerade etener bör ibland utföras tidsmässigt åtskilt. Om delar av akvifären är förorenad med avsevärt högre halter av högklorerade lösningsmedel, relativt lågklorerade, samtidigt som den reduktiva dekloreringen av de högklorerade etenerna går sakta, fastän tydlig fermentation pågår, så kan åtgärden med fördel inledas med bioaugmentation med bakterier som enbart deklorerar de högklorerade molekylerna. Bioaugmentation med *Dhc* bör då inväntas inom detta delområde av akvifären tills större delen av de högklorerade etenerna har deklorerats till lågklorerade. Orsaken är att alla dessa bakterier konkurrerar om befintligt väte. De bakterier som deklorerar de högklorerade etenerna kan i allmänhet lätt utkonkurrera *Dhc* vad gäller konsumtion av vätet. Halten *Dhc* kan då sjunka så lågt att det kräver separat bioaugmentation. Om bildat VC transporteras nedströms detta delområde behöver detta nedströms liggande delområde istället erhålla bioaugmentation med *Dhc* som kan deklorera VC.

Att avvakta med bioaugmentation med *Dhc* bör även övervägas i en situation då halten högklorerade etener är relativt hög, samtidigt som tydlig deklorering av dessa pågår. Någon bioaugmentation med bakterier som deklorerar högklorerade etener behövs då inte, men man kan ändå behöva avvakta bioaugmentation med *Dhc* tills halterna av de högklorerade etenerna är signifikant lägre än av de lågklorerade etenerna. Bakomliggande orsak är samma, dels *Dhc* svaga förmåga att konkurrera om vätet och dels att bakteriehalten av de som deklorerar högklorerade föreningar vanligtvis avtar med minskad halt av dessa föreningar vilket förbättrar konkurrenssituationen för *Dhc*.

Det finns ett flertal tekniska sätt att *in situ* tillföra mikrobiella kulturer för att påskynda reduktiv deklorering av klorerade alifater. Vid tillførseln behöver flera svårigheter beaktas. Exempelvis, det behöver säkerställas dels att *Dhc* inte inaktiveras/dör (*Dhc* kräver bl.a. lågt redox och relativt neutrala pH) när de tillførs *in situ*, dels att distributionen av *Dhc* i akvifären blir god, dels att lämpliga förutsättningar för *Dhc* upprätthålls över tid.

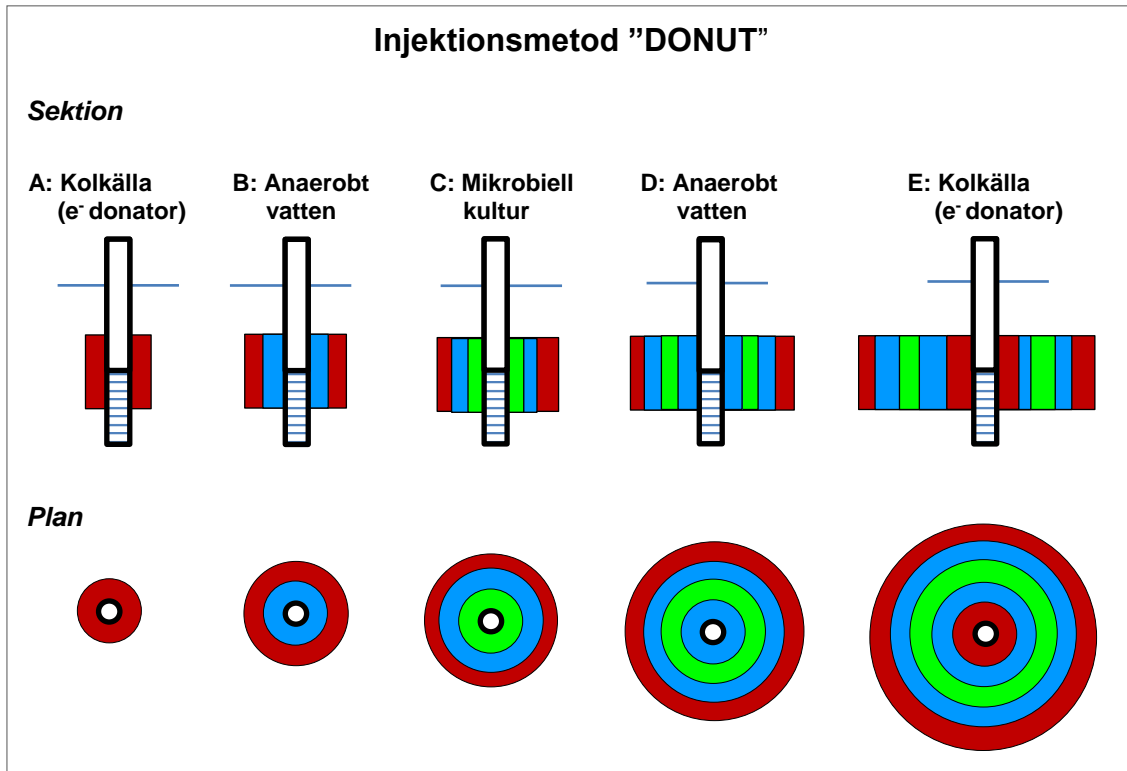
Ett sätt är att först injektera substrat (kolkälla) i akvifären och en tid därefter bakteriekulturen. Målsättningen med det är att fermentation av substrat ska generera tillräckligt lågt redox (så att bl.a. *Dhc* trivs), samtidigt som produktionen av väte blir fördelaktig för den mikrobiella dekloreringen av inte minst lågklorerade etener. Tanken är att *Dhc* ska följa medsubstratet utåt i akvifären. Ett annat sätt är att först tillföra lösningen med bakteriekultur i akvifären och därefter injektera substratet för att trycka kulturen utåt i akvifären. De slutliga vätskelösningar (vatten, bakteriekultur, kolkälla) som tillførs *in situ* har måste vara starkt anaeroba innan injektionen.

Det har i båda fallen visat sig att endast en liten del av kulturen initialt blivit transporterad utåt. Större delen av kulturen blir kvar vid injektionspunkten fastän kolkällan transporterats genom området. Det blir därtill ofta oklart hur mycket längre ut som *Dhc* blivit transporterad, som funktion av tid efter tillsatsen. Ett mindre problem med båda metoderna är att de utförs i två steg med två fältinsatser. Ett större problem är att det vatten som används till att blanda ut kolkällan med inför injektionen behöver ha lågt-mycket lågt redox för att inte tillsatta *Dhc* ska bli obrukbara/dö ut.

För att förbättra utbredningen *in situ* av bakterier och kolkälla har man utfört försök med att tillföra vatten. Tillgången till vatten som har lågt redox är dock vanligtvis begränsad i fält. Vanligt kranvatten, som dock vanligtvis är aerobt, brukar finnas tillgängligt och det har legat till grund för en tredje injektionsmetod/strategi. Denna metod har visat sig kunna förbättra distributionen av bakterier och kolkälla. Dock har man funnit att det finns risk att en mycket stor del av de tillsatta *Dhc* inaktiveras då de kommer i kontakt med detta vatten, som resulterar i långsammare deklorering. Det tar tid för de *Dhc* som överlever innan de når den anaeroba akvifären att växa till i akvifären för att nå upp till halter som är kritiska för deklorering. Denna inaktivering kan delvis motverkats genom att välja en kolkälla som snabbt bryts ned, t.ex. acetat, för att påskynda bildandet av tillräckligt anaeroba förhållanden (genom fermentationen av kolkällan). Inaktiveringen har då främst gällt vid tillredningen samt inledningsvis direkt efter injektionen. Därefter har antalet aktiva *Dhc* växt till sig och ökat i antal.

På senare tid har man vid bioaugmentation med *Dhc* sammanfört och utvecklat ovan nämnda injektionssätt i en och samma strategi, kallad "Donut-metoden". Metoden, som på senare tid blivit använd i allt större utsträckning, utförs principiellt enligt Figur 3.5 med fem olika steg. Kolkälla, vatten och bakterielösning tillsätts likt en sandwich-struktur i vanliga grundvattenrör/brunnar med hjälp av endast gravitationen. Först tillsätts kolkälla (A i figuren). Det efterföljs av vatten, B. Därefter tillførs bakteriekulturen, C, som efterföljs av vatten, D, och kolkälla, E. I motsats till de två första metoderna ovan, där kolkälla/elektronacceptor och bakteriekultur tillsätts i två separata steg med signifikant tid däremellan, tillsätts både bakteriekultur och kolkälla vid en och samma aktivitet med Donut-metoden.

Injektionsstrategin (A-E) i Figur 3.5 gäller för en vertikal nivå. Beroende på hur utbredd föroreningen är i vertikalled kan detta behöva utföras på flera vertikala nivåer i varje injektionspunkt. I figuren tillförs vatten både före och efter tillförsel av koncentrerad mikrobiell kultur. Alternativt utförs ibland ovan mark på plats en tillredning av slutlig koncentration av utspädd bakteriekultur innan injektion varvid vatten – bakteriekultur – vatten-stegen (B-D) slås ihop till ett steg.



Figur 3.5 Schematisk beskrivning av injektionsstrategin "Donut" vid bioaugmentering för reductiv deklorering med *Dhc*.

Vattnet bör ha tillräckligt lågt redox för att underlätta överlevnad av *Dhc*. En utveckling av Donut-metoden är att använda kranvatten och att innan injektion göra det anaerobt på plats i fält genom att blanda in redoxsänkande substrat/ämnen. Med denna variant tillsätts först kranvatten till en stor behållare varefter något kg av redoxsänkande produkt blandas in per m³ vatten. På så sätt kan redox sänkas relativt snabbt (några timmar) i kranvattnet, framför allt om inblandningen görs i rumsvarmt vatten. Vattnet används därefter på samma sätt som kranvattnet i den ursprungliga Donut-metoden.

Exempel på redoxsänkande substrat är de kommersiella produkterna EHCTM (Adventus Inc.) och KB-1[®] Primer (Sirem, 2015b). EHCTM består av en snabb fermenterbar kolkälla och partikulärt nollvärt järn. Innehållet i KB-1[®] Primer är okänt. Om produkter som innehåller nollvärt järn nyttjas innebär det att man tillför en abiotisk dekloreringsfaktor (nollvärt järn). Detta kan visserligen vara fördelaktigt för dekloreringsprocessen men kan eventuellt försvåra utvärdering av den biologiska delen av dekloreringen (förutsatt att järnets abiotiska deklorering blir signifikant, relativt den totala dekloreringen). Tillsats av nollvärt järn kan i övrigt generera både positiva och negativa effekter som man bör beakta, exemplifierat i huvuddokumentet, Avsnitt 4.3.2-4.3.3.

Utöver Donutmetoden har man använt ytterligare två metoder för att sprida *Dhc* i akvifären samtidigt med substrat och vatten. Den ena metoden använder sig av forcerad gradient eller recirkulering i akvifärer som har måttlig till hög hydraulisk konduktivitet. Vatten pumpas upp

från akvifären ur extraktionsbrunnar in i en speciell tillsluten behållare varefter bakteriekultur och kolkälla tillsätts innan det uppblandade vattnet pumpas ned i den förorenade akvifären i injektionsbrunnar. Halten av kolkälla i det nedpumpade vattnet är vanligtvis betydligt lägre än för icke-recirkulerande metoder. Recirkuleringen av vatten sker kontinuerligt. Tillsats av nytt vatten, bakterier och kolkälla sker ofta pulsvis, men kan också ske kontinuerligt. Halterna av tillsatserna i den utgående vätskan är vanligtvis högre för pulserad tillförsel, jämfört med kontinuerlig tillförsel.

Metoden genererar stora möjligheter att tekniskt kontrollera och optimera dekloreringsprocessen *in situ*. Metoden kan signifikant påskynda dekloreringen men den är vanligtvis betydligt mer kostnadskrävande än icke-cirkulerande metoder. Den kräver kontinuerligt nyttjade av markutrymme (behållare/tankar, rör, processutrustning, el) som ibland kan göra andra icke-cirkulerande injektionsmetoder mer fördelaktiga. Därtill kan recirkuleringsystem orsaka mer mikrobiell igensättning av rör, än alternativen.

Den andra metoden har likheter med Donut-metoden men istället för tillförsel i brunnar med hjälp av gravitationen så trycks lösningarna ut i akvifären med hjälp av trycksatt borrutrustning i ett stort antal punkter (ej i befintliga brunnar). Med detta erhålls bättre initial distribution av *Dhc* samt kortare tid för *Dhc* att transporteras till mindre områden med lokalt förhöjda halter av klorerade etener. Nackdelen är ökade kostnader för ökat antal injektionspunkter samt borrhög, jämfört med metoder som endast kräver tillförsel i befintliga grundvattenrör/-brunnar.

3.4.3 Exempel på kemiskt – mikrobiellt utfall

I Tabell 3.5 ges exempel på resultat från analys av grundvattenprov tagna dels en vecka före bioaugmentation (motsvarade fjorton månader efter biostimulering) och dels sju månader efter bioaugmentation. Provtogs även tre månader efter bioaugmentationen och redan då noterades tydlig ökad dekloreringsgrad av lågklorerade etener.

Strax före bioaugmentationen fanns varken *Dhc* eller funktionella gener som kan kopplas till de *Dhc* som har potential att deklorera klorerade etener i mätbara halter. Dekloreringsgraden var 50 %.

Sju månader efter bioaugmentationen fanns både *Dhc* och defunktionella generna i signifikant höga halter. Därtill uppvisade proverna en tydligt ökad dekloreringsgrad av alla klorerade etener, inklusive VC. Dekloreringsgraden var nu uppe i 82 %. Resultaten visar tydligt att dekloreringsgraden av de lågklorerade etenerna tog fart genom bioaugmentationen, som resulterade i fullständig dekloreringsgrad.

I Figur 3.6 ges resultat erhållna parallellt i en annan provpunkt som genomgått samma biostimulering och bioaugmentation. Figuren visar haltförändringar över tid av *cis*-DCE, VC och eten + etan, *Dhc*, och generna *bvcA* + *vcrA* samt *tceA* både före och efter biostimuleringen samt före och efter bioaugmentationen. Även här indikeras att bioaugmentationen (tillsatsen av *Dhc* med nödvändiga gener) startade dekloreringsgraden av *cis*-DCE (visas indirekt via ökad VC-produktion) och VC (ökad produktion av eten+etan).

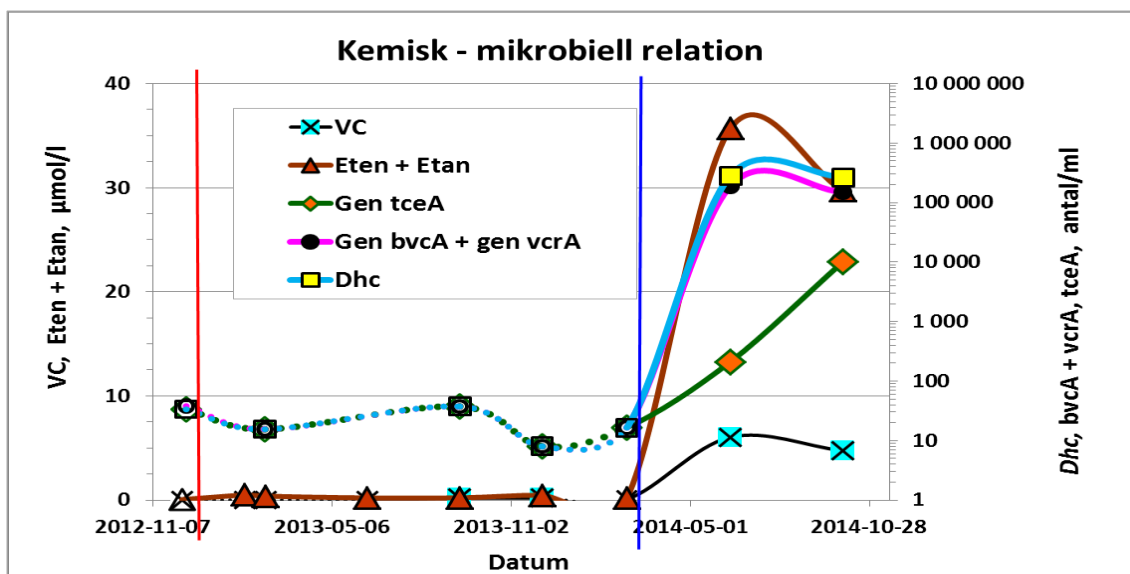
Tabell 3.5 Mikrobiell analys av vattenprov tagna i samma provpunkt dels strax före bioaugmentation, dels sju månader efter bioaugmentation. Data från Branzén och Ländell, 2017.

Analys	Enhet	En vecka före bioaugmentation 1/	Sju månader efter bioaugmentation
KEMISKT			
PCE	µg/l	25	u.d.
TCE	µg/l	25	3
<i>cis</i> -DCE	µg/l	1860	1450
<i>trans</i> -DCE	µg/l	10	33
VC	µg/l	u.d.	296
Eten	µg/l	1	834
Dekloreringsgrad (DKG)	%	50	82
MIKROBIELLT, detektionsgräns	antal/ml	3,3 • 10¹	9,5 • 10¹
Totala bakterier	celler/ml	7,5 • 10 ⁶	2,4 • 10 ⁶
Järnreducerande bakterier (<i>Geobacter</i> spp.)	celler/ml	3,6 • 10 ⁵	5,8 • 10 ⁴
Dekloreerande bakterier			
<i>Dehalococcoides</i> spp.	celler/ml	u.d.	2,7 • 10 ⁵
<i>Dehalobacter restrictus</i>	celler/ml	3,9 • 10 ⁴	2,7 • 10 ⁴
<i>Dehalobacter</i> sp. strain TCA1	celler/ml	u.d.	u.d.
<i>Desulfuromonas</i> spp.	celler/ml	u.d.	u.d.
Funktionella gener			
<i>tceA</i> (TCE reaktiv dehalogenas)	DNA-kopior/ml	u.d.	1,0 • 10 ⁴
<i>vcrA</i> (VC reuktas)+ <i>bvcA</i> (VC reuktas) 2/	DNA-kopior/ml	u.d.	1,5 • 10 ⁵
<i>dsrA</i> (sulfid reuktas) + <i>dsrB</i> (sulfid reuktas)	DNA-kopior/ml	3,2 • 10 ³	2,0 • 10 ³
<i>mcrA</i> (metyl coenzym M reuktas)	DNA-kopior/ml	4,2 • 10 ⁴	1,4 • 10 ⁴

u.d. = Under detektionsgräns.

1/ Provet togs fjorton månader efter biostimulering (Tabell 3.4).

2/ Dataunderlaget indikerade, i de fall *vcrA* och *bvcA* analyserades separat, att summan till största del bestod av *vcrA*.



Figur 3.6 Relation över tid i vattenprov mellan halter av VC, eten+etan, *Dehalococcoides* sp. (*Dhc*) och deras gener *bvcA* + *vcrA* som är kopplade till metabol deklorering av bl.a. VC (*tceA* attackerar dock VC cometaboliskt). Röd vertikal linje: Tid för biostimulering. Blå vertikal linje: Tid för bioaugmentation. Alla ofyllda punkter motsvarar värden under respektive rapporteringsgräns (gäller för de flesta värden före bioaugmentationen, undantaget främst eten+etan). Observera logaritmisk skala på höger y-axel. (Data från Branzén och Ländell, 2017).

Som noteras i Tabell 3.5 bestod summan av *vcrA* och *bvcA* sannolikt till största delen av *vcrA*, baserat på analyser som separerade dessa två gener (Branzén och Ländell, 2017). I Figur 3.6 verkar relationen mellan *vcrA* + *bvcA* och *Dhc* vara avsevärt bättre än mellan *tceA* och *Dhc*. Detta är i linje med erfarenheter från undersökning av 11 klorerade lösningsmedelsförorenade akviferer i Europa (van der Zaan *et al.*, 2010). Man fann där att *Dhc* (analyserat som *Dehalococcoides* 16S rRNA) och *vcrA* korrelerade bättre vid låga redox, jämfört med *tceA* och *bvcA* som istället blev bättre vid högre redox.

I Kapitel 2 (Tabell 2.3) angavs att genen *bvcA* är kopplad till stammen *Dehalococcoides* sp. strain BAV1, medan genen *vcrA* är kopplad till stammarna *Dehalococcoides* sp. strain VS och *Dehalococcoides* sp. strain GT. I ovan angiven rapport av van der Zaan *et al.* (2010) anges att de i tester erhöll resultat som indikerade konkurrens mellan dels de bakterier som innehade *vcrA* och dels de som innehade *bvcA* samt att bakterierna med *vcrA* var mer effektiva i sin tillväxt. De ansåg också att detta styrkes av att det i litteraturen finns beskrivet att tillväxttiden för *Dehalococcoides* sp. strain BAV1 kan vara dubbelt så lång som för bakterierna som har genen *vcrA*. Hypotetiskt kan liknande orsaker legat bakom utfallet i bl.a. Tabell 3.5.

3.5 Kostnader

Kostnader för biostimulering och bioaugmentation kan variera avsevärt beroende på plats-specifika förhållanden. Viktiga styrande parametrar är bl.a. lämplig kolkälla (saneringstid vs. snabbt eller långsamt fermenterande, dess viskositet, injektionsfrekvens etc.) och halt i akvifären av injikerad kolkälla (alltför lite genererar alltför låga vätehalter men alltför mycket kan ge problematiskt höga metan- och svavelvätehalter). Vidare är nödvändig volym av lämplig bakterielösning (för att nå slutligt tillräckligt hög bakteriekoncentration) och avstånd mellan injektionspunkterna viktiga parametrar samt eventuellt behov av recirkulering för att förbättra distributionen av bakterierna inom det område som ska behandlas. Sådana parametrar styrs i sin tur bl.a. av det förorenade områdets mäktighet och hur djupt föroreningen ligger, dess hydrauliska konduktivitet, heterogenitet och föroreningens halter och spatiala utbredning.

Saneringskostnaderna blir naturligt mycket högre för behandling av stora mängder lösta föroreningar inom begränsade volymer som genererar höga eller mycket höga föroreningshalter (frekventa, eller till och med kontinuerliga, injektioner, sammantaget stora mängder substrat och bakterielösning, högfrekvent provtagning, etc.), jämfört med i plymen där föroreningshalterna kan vara avsevärt lägre (betydligt mindre frekventa injektioner med eventuellt långsammare substratblandning och bioaugmentation med så låg frekvens så att eventuellt endast en omgång är tillräcklig).

Kostnader för bakterielösning innehållande *Dhc* är direkt kopplat till krav på halter av *Dhc* i akvifären. I huvuddokumentet (Avsnitt 2.2) angavs att minikravet är ca 10^6 celler av *Dhc*/liter akvifärvatten för att stor potential för effektiv deklorering av lågklorerade etener ska gälla. Antag att en förorenad akvifär har $10\ 000\ \text{m}^3$ förorenad jordvolym och att den har en porositet av 0,25. Det motsvarar $2\ 500\ \text{m}^3$ akvifärvatten. Antag att analyser visat att den inte innehåller detekterbara *Dhc*. Det innebär att $2,5 \cdot 10^{12}$ stycken *Dhc* krävs/behöver tillsättas (homogent fördelade) för att uppnå 10^6 celler/liter vatten, förutsatt att alla tillsatta *Dhc* kommer att finnas aktiva i akvifärens vatten.

I fälttestet i Alingsås (Branzén och Ländell, 2017) användes produkten KB-1[®]. Den innehöll minst $1 \cdot 10^{11}$ celler av *Dhc* per liter produkt (enligt produktspecifikation, utspädd). Kostnaden för KB-1[®], exklusive transportkostnader från SiREM Lab, Kanada, var ca 2 500 SEK/liter exkl. VAT. För den antagna akvifären på $10\ 000\ \text{m}^3$ skulle kostnaden (exkl. VAT och transport) då bli ca 60 000 SEK (i februari 2016 års penningvärde) för att nå 10^6 celler/liter (baserat på samma antagande som ovan). Observera att kostnaden kan variera beroende på produkt, volym och leverantör. Det finns till idag (februari 2016) ett flertal internationella leverantörer (t.ex. BCI Labs, EBS Info, EOS Rem, Regenesys, SiREM Lab, Terra System, Bioclear) med egna specifika blandningar och koncentrationer av olika mikroorganismer. För verifiering av uppnådda halter tillkommer kostnader för mikrobiella analyser, se huvudrapportens Avsnitt 5.2.3.

Man bör tillse att halterna av *Dhc* initialt blir högre i grundvattnet än 10^6 celler/liter vatten om man vill få igång reduktionen snabbt. Bakterier kan ta på sig någon/några veckor upp till någon månad att bli aklimatiserade i den nya miljön (lag-fas tid). Under denna tid sker inte någon nämnvärd tillväxt och inte heller nedbrytning. Därtill, om deras koncentration från början är alltför låg kan deras tillväxt i värsta fall utebli (beroende på vilka de redan befintliga mikrobiella förhållandena är).

I fälttest i Alingsås utfördes både biostimulering och bioaugmentation i pilotskala. Utförandet var begränsat till ett litet delområde och delvis av forskningskaraktär. Kostnaderna för de fältmässiga injektionerna bör härav blivit högre per aktivitet, jämfört med i fullskala. Kostnaderna för att utföra biostimulering i nio intill varandra liggande punkter uppgick till ca 10 000 SEK/injektionspunkt (inkl. etablering och avetablering). Som kolkälla/substrat användes en blandning av produkterna Newman Zone[®] och melass som kostade ca 60 SEK/kg respektive ca 30 SEK/kg, vilka genererade en total produktkostnad av totalt 10 000-11 000 SEK. Denna substratblandning bestod till största delen av Newman Zone[®].

Till skillnad från biostimuleringen utfördes bioaugmentationen med Donutmetoden i två befintliga rör utan pålagt tryck. Detta genererade betydligt långsammare tillförsel av en volymenhet vätska samt längre total aktivitetstid per enskilt rör och därmed tid/punkt i fält, jämfört med biostimuleringen. Den senare utfördes med enkel trycksatt injektionsutrustning direkt ned i marken.

Kostnaden för:

- bakterielösningen KB-1[®] (koncentrat med ca 10^{11} *Dhc*-celler/liter) var ca 7 500 SEK/tre liter (ca 2 500 SEK/liter),

- transport av bakterielösningen från Kanada samt återsändande av dess specialbehållare var ca 11 000 SEK,
- tillredning av slutlig bakterielösning i fält (ca 10^9 Dhc-celler/liter slutlig injektionsvätska) var ca 6 000 SEK,
- tillförsel av bakterielösning i befintligt grundvattenrör (eller i annat för ändamålet etablerat rör) inkl. etablering och avetablering var ca 40 000 SEK/rör. Denna kostnad per rör ligger i det övre kostnadsintervallet då den baseras på bioaugmentation i endast två rör. För fler rör skulle den totala kostnaden per rör i princip ha minskat.

Eftersom biostimulering utfördes innan bioaugmentationen, tillsattes endast en liten mängd av kolkälla under bioaugmentationen, motsvarande för detta specifika test volymmässigt 1-2 % av vad som tillfördes under biostimuleringen.

I Tabell 3.6 ges exempel på några platsspecifika egenskaper och faktorer som var för sig påverkar totalkostnad och möjligheter att realisera fullskaleutförande med förstärkt mikrobiell reduktiv deklorering i akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel. Tabellen gäller främst nyttjandet av oljeemulsioner som substrat men kan även översiktligt gälla för nyttjande av andra, mer snabbfermenterande, substrat. Det förutsätts att det inte föreligger, eller kommer att föreligga, risk för att eventuella receptorer nedströms det förorenade området blir påverkade. Förorening ska kunna nås i aktuellt medium/akvifär med en injektionsteknik lämpad för vätskelösningar av olika viskositeter så att tillräckligt bra spridning av injekterat substrat erhålls. Källområde bör antas inneha små volymer fri produkt. Större volymer förutsätts innan ha åtgärdats.

Tabell 3.6 Exempel på några platsspecifika egenskaper och faktorer som var för sig påverkar möjligheterna att realisera ett fullskaleutförande med förstärkt mikrobiell reduktiv deklorering i akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel (AFCEE, 2007).

Platsspecifika egenskaper	Enklare att realisera – Kostnader i undre delen av kostnadsintervall	Normalkostnader	Svårare att realisera – Kostnader i övre delen av kostnadsintervall
Biologisk nedbrytningspotential	Det pågår långsamt fullständig deklorering, begränsad av för låga halter substrat (behov av biostimulering)	Dekloreringen stallat (stoppat) vid cis-DCE eller vid VC, indikerande behov av bioaugmentation	Ingen tydlig deklorering pågår, nödvändiga bakterier saknas; behov av biostimulering och bioaugmentation
Källområde	<4 000 m ²	4 000-16 000 m ²	>16 000 m ²
Plymstorlek	<20 000 m ²	20 000-80 000 m ²	>80 000 m ² (övertväg biobarriärer för plymkontroll)
Vertikalt avstånd till förorening 1/	15 m	15-30 m	>30 m
Hydraulisk konduktivitet	>3 m/dygn	0,3-3 m/dygn	<0,3 m/dygn
Grundvattenhastighet	6 m/år-0,6 m/dygn	0,3-6 m/år eller 0,6-1,5 m/dygn	<0,3 m/år eller >1,5 m/dygn
Akvifärens heterogenitet	Homogen akvifär	Moderat homogen akvifär	Heterogen akvifär i vilken det är svårt att karaktärisera föroreningens flödesvägar
Sulfathalt 2/	<500 mg/l	500-5000 mg/l	>5000 mg/l
pH	6,5-8,5	5,5-6,5	<5,5 eller >8,5

1/ Ju djupare föroreningen finns desto dyrare blir injektionerna (större injektionsutrustning, större rigg, högre injektionsstryck, djupare nedtryckning eller borrhål etc.).

2/ Höga sulfathalter kan ge avsevärd konkurrens av tillgängligt löst väte (genererad via fermentation), vilket hämmar den reduktiva dekloreringen. Kan motverkas med måttligt ökade tillsatta mängder av, och därmed även kostnader för, fermenterbar kolkälla och dess injektion. Därtill, ju högre sulfathalter, desto större potential för humantoxisk vätesulfid (svavelväte). Kan kräva extra skyddskostnader. Om järn finns i akvifären kan sulfid bilda järnsulfider som kan generera kemisk deklorering av vissa klorerade lösningsmedel.

3.6 Biobarriär

Biobarriär placeras i förorenade plymer med målsättningen att avgränsa föroreningsutbredningen och/eller att bryta ned föroreningarna som passerar igenom barriären. I plymer, förorenade med klorerade lösningsmedel, tillförs ämnen/material/ mikroorganismer i barriären med målsättning att få till stånd en reaktiv zon genom biostimulering, bioaugmentation eller båda. Avgränsningen har som målsättning att motverka vidare förorenings-spridning inne i plymen på fastigheten eller plymutbredning över fastighetsgränsen. Målsättningen kan exempelvis vara att reducera mängd förorening i plymen nedströms barriären med 95 % genom att förhindra att föroreningen passerar barriären.

Barriärens funktion baseras generellt på att det förorenade grundvattnet transporterar sig genom en reaktiv zon, placerad vinkelrät mot grundvattenströmmen. Därtill ska barriären täcka en tillräckligt stor sträcka över plymen. Barriären ska orsaka en tillräckligt lång uppehållstid för föroreningarna när de transporteras genom barriären så att fullständig deklorering hinner ske. Det är också viktigt att barriären har tillräckligt god permeabilitet så att plymen inte går utanför/runt, över eller under barriären.

En biobarriär kan bestå av en permeabel konstruktion som placeras i plymen. I biobarriären tillsätts ämnen/material/bakterierna. För deklorering av klorerade lösningsmedel, som kan finnas i stora plymer med betydande utbredning både horisontellt och vertikalt, är det mer vanligt att designa barriären som enkelrad av något eller några tiotals injektionsbrunnar med t.ex. fem meters mellanrum, placerade vertikalt mot plymriktningen. Alternativt kan brunnarna spridas ut tvådimensionellt över lämplig yta. Exempelvis, om enkelraden består av 15 brunnar bör minst 5 kontrollrör placeras vid fastighetsgränsen, nedströms barriären. Alternativt till sådan enkelrad med 15 brunnar i rad kan brunnarna placeras så att de täcker en yta i plymen av storleksordningen 250 m². Design beror bl.a. på plymbredd och nödvändig procentuell halt- eller mass-reduktion relativt halterna uppströms barriären.

Biobarriär, som placeras i en akvifär förorenad av klorerade lösningsmedel, har alltså det huvudsakliga syftet att genom biologisk nedbrytning, påskyndad med biostimulering och/eller med bioaugmentation, genom mikrobiell nedbrytning motverka och avgränsa fortsatt spridning av förorening. Bioaugmentationen utförs vanligtvis endast inledningsvis, i motsats till biostimuleringen som kan behöva utföras kontinuerligt eller i perioder (t.ex. med något till några års mellanrum). Tidpunkter för sådana injektioner baseras på det kemiska och mikrobiella utfallet i lämpligt placerade kontrollbrunnar. Kontrollprovtagningarna bör utföras kvartalsvis de första fem åren, varefter de bör utföras halvårsvis.

Barriärens livslängd bör vara tillräckligt lång så att när dess funktion har upphört så bör halterna uppströms barriären vara lägre än kravet för plymen nedströms. Detta innebär att för akvifärer förorenade med klorerade lösningsmedel kan barriärens livslängd behöva vara åtskilliga tiotals år. Det är dock vanligt att då områden uppströms biobarriären innehar höga halter av förorening så behandlas dessa separat med någon aktiv metod, samtidigt som biobarriären är aktiv. Den totala nödvändiga livstiden för barriären blir då avsevärt kortare.

Val av biostimulerande kolkälla/substrat är delvis kopplat till hur det är avsett att agera samt hur länge. Funktionen hos en biobarriär är inte att snabbt åtgärda/bryta ned förorening utan dess funktion är istället att avgränsa föroreningsutbredningen. Den kan därför tillåtas att verka under lång tid.

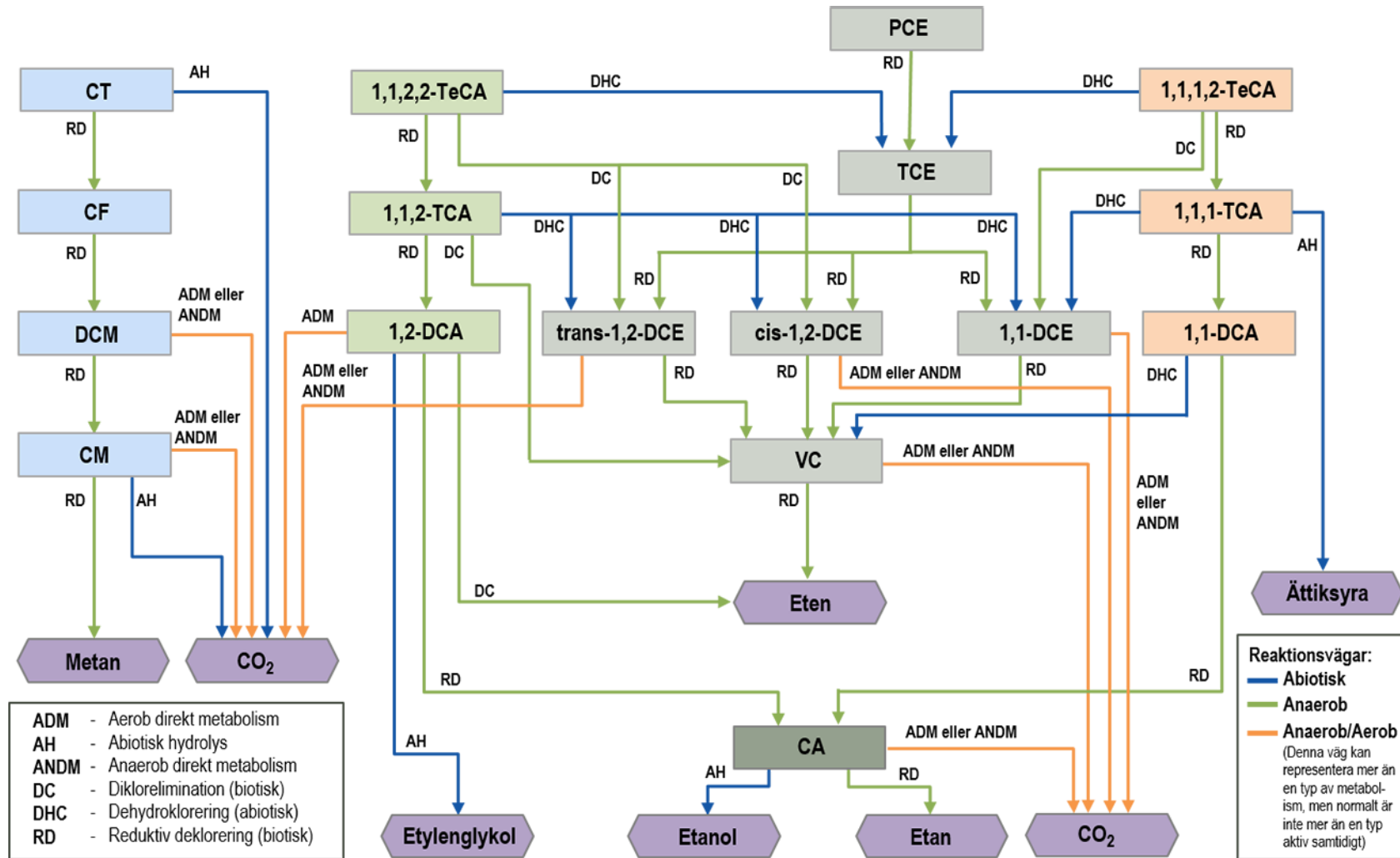
Barriären bör ha en fast struktur som stödjer avsedd bakterietillväxt och tillräckligt lång uppehållstid av föroreningarna. Det är därför lämpligt att substratet är i fast form och har acceptabelt långsam löslighet (av dess fermentativa innehåll) för att upprätthålla tillräckligt lång varaktighet, men ändå via fermentationen generera tillräckligt med väte för deklorering av de molekyler

som transporteras in i barriären. Vanliga substrat till sådana biobarriärer är kompostmaterial och/eller kitin (AFCEE, 2004).

Det kan tilläggas att en vanlig variant av barriär, som delvis kan stimulera biologisk nedbrytning men med kemisk nedbrytning som huvudfokus, har finkornigt nollvärt järn som sitt huvudsakliga aktiva innehåll. Som beskrevs i huvuddokumentet (Avsnitt 4.4.2 – 4.4.3) kan nollvärt järn stödja både kemisk och mikrobiell reduktiv deklorering.

4. Reaktionsvägar

Figur 4.1 ger en sammanfattning av ett flertal av de idag mest kända reaktiva och oxidativa möjligheterna att bryta ned klorerade metaner, etaner och etener. I figuren saknas dock bl.a. en viss typ av abiotisk deklorering av kloreterener som kan ge olika acetylen. Exempelvis är det idag känt att PCE kan dekloreras abiotiskt till dikloracetylen (avsnitt 4.4.2 i huvuddokumentet) som i sin tur kan dekloreras till kloracetylen som i sin tur kan dekloreras till dels VC och dels acetylen. *Cis*-DCE och *trans*-DCE kan abiotiskt dekloreras till acetylen, medan VC kan dekloreras abiotiskt till bl.a. eten/etan. I Tobiszewski och Namieśnik (2012) ges en sammanfattning av abiotisk deklorering av klorerade etener och etaner.



Figur 4.1 Reaktionsvägar för klorerade etener, etaner och metaner. Reaktionen med $t_{1/2} > 200$ år ej medtagna. Figuren delvis modifierad. Ursprungligt underlag dels från US DOE, 2006c och dels från AFCEE, 2007. Beskrivning av givna principiella reaktioner ges i Field och Sierra-Alvarez (2004).

Bilaga 2

Referenser

Referenser

- Aceves-Lara C.-A., Latrille E., Conte T., Steyer J.-P., 2012. Online estimation of VFA, alkalinity and bicarbonate concentrations by electrical conductivity measurement during anaerobic fermentation. *Water Sci. Technol.*, vol. 65, no. 7, pp. 1281-1289.
- Adrian L., Dudkova V., Demnerova K., Bedard D., 2009. “*Dehalococcoides*” sp. strain CBDB1 extensively dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 13, pp. 4516-4524. 160219: <http://aem.asm.org/content/75/13/4516.full.pdf+html>
- AFCEE, 2004. Principles and practices of enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents. The Air Force Center for Engineering and the Environment, USA. 151028: http://costperformance.org/remediation/pdf/principles_and_practices_bioremediation.pdf
- AFCEE, 2007. Protocol for in situ bioremediation of chlorinated solvents using edible oil. The Air Force Center for Engineering and the Environment, USA. 150410: <http://www.clu-in.org/download/techdrct/Final-Edible-Oil-Protocol-October-2007.pdf>
- Amos B., Christ J., Abriola L., Pennell K., Löffler F., 2007. Experimental evaluation and mathematical modeling of microbially enhanced tetrachloroethene (PCE) dissolution. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 41, pp. 963-970.
- Atlas R., Schofield E., 1975. Petroleum biodegradation in the Arctic. In *Proceedings of the workshop-symposium hosted by US EPA, Florida: Impact of the Use of Microorganisms on the Aquatic Environment*. EPA 660-3-75-001. Editors: Bourquin A., Ahearn D., Meyers S.
- AU, 2016. Numerical transport modelling. *Water and Environment, Department of Civil Engineering, Aalborg University*. DK. 160622: <http://www.water.civil.aau.dk/gw/7%20-%20numerical%20transportmodelling.pdf>
- Bardos P., Bone B., Cernik M., Elliott D., Jones S., Merly C., 2015. Nanoremediation and international environmental restoration markets. *Remediation J.*, vol. 25, no. 2, pp. 83-94. 150422: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rem.21426/epdf>
- Bedard D., 2014. PCB dechlorinases revealed at last. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. vol. 111, no. 33, pp. 11919-11920. 150413: <http://www.pnas.org/content/111/33/11919.full.pdf>
- Behrens S., Azizian M., McMurdie P., Sabalowsky A., Dolan M., Semprini L., Spormann A., 2008. Monitoring abundance and expression of “*Dehalococcoides*” species chloroethene-reductive dehalogenases in a tetrachloroethene-dechlorinating flow column. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 18, pp. 5695-5703.
- Bioclear, 2015. Microaerophilic degradation. 150402: <http://www.microbialanalysis.com/en/q-bioanalyses/degradation-pollutants/microaerophilic-dechlorination>
- Bioclear, 2015b. *Dehalococcoides* + Vinyl Chloride reductase. 150402: <http://www.microbialanalysis.com/en/q-bioanalyses/degradation-pollutants/dehalococcoides-vinyl-chloride>
- 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. 150429: <http://www2.er.dtu.dk/publications/fulltext/2006/MR2006-275.pdf>

- Bowman K., Nobre F., da Costa M., Rainey F., Moe W., 2013. *Dehalogenimonas alkenigignens* sp. nov., a chlorinated-alkane-dehalogenating bacterium isolated from groundwater. *IJSEM*, vol. 63, no. 4, pp. 1492-1498.
- Bradley P., 2003, History and ecology of chloroethene degradation - A review: *Bioremediation Journal.*, vol. 7, no. 2, pp. 81-109.
- 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. 150402: <http://pubs.usgs.gov/sir/2012/5032/pdf/sir2012-5032.pdf>
- Bradley P., 2012. Microbial mineralization of *cis*-dichloroethene and vinyl chloride as a component of natural attenuation of chloroethene contaminants under conditions identified in the field as anoxic. Scientific Investigations Report 2012–5032. United States Geological Survey. pp. 1-2. 150402: <http://serdp-estcp.org/content/download/14933/172078/file/ER-1558-FR.pdf>
150402: [http://serdp-estcp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Contaminated-Groundwater/ER-1558/ER-1558/\(language\)/eng-US](http://serdp-estcp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Contaminated-Groundwater/ER-1558/ER-1558/(language)/eng-US)
- Bradley P., 2012b. Chapter 1. Strategic environmental research and development program project summary. In *Microbial Mineralization of cis-Dichloroethene and Vinyl Chloride as a Component of Natural Attenuation of Chloroethene Contaminants under Conditions Identified in the Field as Anoxic*. Scientific Investigations Report 2012–5032. United States Geological Survey, pp. 7-10. 150402: <http://serdp-estcp.org/content/download/14933/172078/file/ER-1558-FR.pdf>
- 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. 150402: <http://pubs.usgs.gov/sir/2012/5032/pdf/sir2012-5032.pdf>
- Bradley P., Chapelle F., Löffler F., 2012. Anoxic mineralization: Environmental reality or experimental artifact? In *Microbial Mineralization of cis-Dichloroethene and Vinyl Chloride as a Component of Natural Attenuation of Chloroethene Contaminants under Conditions Identified in the Field as Anoxic*. Scientific Investigations Report 2012–5032. United States Geological Survey, pp. 7-10. 150402: <http://serdp-estcp.org/content/download/14933/172078/file/ER-1558-FR.pdf>
- Branzén H., Ländell M., 2017. *Mikrobiell nedbrytning av klorerade alifater*. Tvätteriet Alingsås. Statens geotekniska institut. Dnr 1.1-1208-0576. (Ännu inte publicerad)
- Carr C., Garg S., Hughes J, 2000. Effect of dechlorinating bacteria on the longevity and composition of PCE-containing nonaqueous phase liquids under equilibrium dissolution conditions. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, pp. 1088-1094.
- CDC, 2015. Hydrogen sulfide. *The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*. Centers for Disease Control and Prevention, USA. 150412: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/7783064.html>
- Chapelle F., Vroblesky, D., Woodward, J., Lovely, D., 1997. Practical considerations for measuring hydrogen concentrations in groundwater. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 31, pp. 2873-2877.
- Chapelle F., 2001. *Ground-water microbiology and geochemistry*. John Wiley & Sons.
- Cheng D., He J., 2009. Isolation and characterization of “*Dehalococcoides*” sp. strain MB, which dechlorinates tetrachloroethene to *trans*-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 18, pp. 5910-5918.

- Cheng D., Chow W., He J., 2010. A *Dehalococcoides*-containing co-culture that dechlorinates tetrachloroethene to trans-1,2-dichloroethene. *The ISME Journal*, vol. 4, pp. 88-97. International Society for Microbial Ecology. 160404: <http://www.nature.com/ismej/journal/v4/n1/pdf/ismej200990a.pdf>
- CityChlor, 2013. Biodegradation capacity in Utrecht. Determining biodegradation processes for chlorinated contaminants using innovative next level monitoring techniques. *Project CityChlor. European Regional Development Funding through Interreg IVB*. 150402: http://www.citychlor.eu/sites/default/files/06_03_biodegradation_capacity_in_utrecht.pdf
- CityChlor, 2013b. CityChlor Think-Tank. Conceptual Site Model. Bio-washing machine. Version 3.0. 151008: http://www.citychlor.eu/sites/default/files/06_00_csm_model_bio-washing_machine_v3.0.pdf
- Coleman N., Mattes T., Gossett J., Spain J., 2002. Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. *Appl. Environ Microbiol.*, vol. 68, no. 12, pp. 6162-6171.
- Criddle C., Dybas M., Tataru G., Warnick L., Vidal-Gavilan G., Robertson A., Lewis T., 2013. Bioaugmentation with *Pseudomonas stutzeri* KC for carbon tetrachloride remediation. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H. Eds., Springer NY.
- Crimi M., 2010. Toward an improved systematic approach for site-specific engineering. ISCO. *ATV Theme Day Winter Meeting, Dk*. 151203: http://www.atv-jord-grundvand.dk/Afholdte_moeder/100309vingsted2010/Temadag/Michelle%20Crimi.pdf
- Damgaard I., Bjerg P., Baelum P., Scheutz C., Hunkeler D., Jacobsen C., Tuxen N., Broholm M., 2013. Identification of chlorinated solvents degradation zones in clay till by high resolution chemical, microbial and compound specific analysis. *J. Cont. Hydrol.*, vol. 146, pp. 37-50.
- Da Silva M., Alvarez P., 2008. Exploring the correlation between halo-respirer biomarker concentrations and TCE dechlorination rates. *J. Environ. Eng.*, vol. 134, pp. 895-901.
- DCC, 2009. Chemicals used in drycleaning operations. Rev. July 2009. Dryclean Coalition, USA. 151222: <https://drycleancoalition.org/chemicals/chemicalsusedindrycleaningoperations.pdf>
- deBruin W., Kotterman J., Posthumus M., Schraa G., Zehnder A. 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethylene to ethane. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, pp. 1996-2000. 151124: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195716/pdf/aem00047-0210.pdf>
- De Wildeman S., Diekert G., Van Langenhove H., Verstraete W., 2003. Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 9, pp. 5643-5647.
- Delgado A., Parameswaran P., Fajardo-Williams D., Halden R., Krajmalnik-Brown R., 2012. Role of bicarbonate as a pH buffer and electron sink in microbial dechlorination of chloroethenes. *Microbial Cell Factories*, vol. 11, pp. 128-138. 150416: <http://www.microbialcellfactories.com/content/pdf/1475-2859-11-128.pdf>
- Duret A., Holliger C., Maillard J., 2012. The opportunistic physiology of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1 towards organohalide respiration with tetrachloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.01221-12. *AEM Accepted, published online ahead of print on 22 June 2012.*

- Edwards E., 2013. New frontiers in bioremediation. *Agricultural Bioscience International Conference 2013*. 150416: http://www.abic.ca/abic2013/PDF/SPEAKER_PRESENTATION/ElizabethEdwards.pdf
- Eltschlager K., Hawkins J., Ehler W., Baldassare, F., 2001, Technical measures for the investigation and mitigation of fugitive methane hazards in areas of coal mining. *U.S. Department of the Interior, Office of Surface Mining Reclamation and Enforcement, Appalachian Regional Coordinating Center, Pittsburgh, PA.*, 124 p. 150512: <https://fs.ogm.utah.gov/FILES/COAL/GENERAL/INTERAGENCY/2003/03272003/0001.pdf>
- Englöv P., Cox E., Durant N., Dall-Jepsen J., Højbjerg Jørgensen T., Nilsen J., Törneman N., 2007. Klorerade lösningsmedel – Identifiering och val av efterbehandlingsmetod. *Hållbar sanering Rapport 5663 samt Bilaga A och Bilaga B. Naturvårdsverket.*
- ESTCP, 2003. Reductive Anaerobic Biological In Situ Treatment Technology (RABITT) Treatability Testing. ER-199719. 151022: <https://www.serdp-estcp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Contaminated-Groundwater/ER-199719>
- ESTCP, 2008. Workshop on *In Situ* biogeochemical transformation of chlorinated solvents. ADA 501302. AFCEE, ESTCP, NFESC. Brooks-City Base, USA. Prepared by CDM. 151022: www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA501302
- ESTCP, 2010. Emulsified zero-valent nano-scale iron treatment of chlorinated solvent DNAPL source areas. Cost and performance report. ER-200431. *Environmental Security Technology Certification Program. U.S. Department of Defense*. 150421: https://clu-in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Treatment_Technologies/DNAPL-ZVI-ER-200431-C&P.pdf
- ESTCP, 2010b. Loading rate and impacts of substrate delivery for enhanced anaerobic bioremediation. Cost and performance report. U.S. Department of Defense (ER-200627) 150615: http://costperformance.org/remediation/pdf/loading_rate_impacts_substrate_delivery_for_enhanced_bioremediation.pdf
- ESTCP, 2010c. Loading rate and impacts of substrate delivery for enhanced anaerobic bioremediation. Final report. U.S. Department of Defense. ESTCP Project ER-0627-FR-1. 150616: http://www.clu-in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Treatment_Technologies/ER-0627-FR-1.pdf
- ESTCP, 2011. Application of nucleic acid-based tools for monitoring monitored natural attenuation (MNA), biostimulation and bioaugmentation at chlorinated solvent sites. Guidance protocol. U.S. Department of Defense. *ESTCP Project ER-0518*. 150408: <http://www.cluin.org/download/techfocus/biochlor/Bio-MNA-ER-200518-Guidance.pdf>
- ETB, 2015. Solubility of gases in water. *Engineering ToolBox*. 150512: http://www.engineeringtoolbox.com/gases-solubility-water-d_1148.html
- Field J., Sierra-Alvarez R., 2004. Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Science dossier, EUROCHLOR*. 150423: <http://www.eurochlor.org/media/14948/sd8-biodegradabilityp1-final.pdf>
- Frasconi D., Zanolli G., Danko A., 2015. In situ cometabolism of chlorinated solvents: A review. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 283, pp. 382-399.
- Friis A., Heimann A., Jakobsen R., Albrechtsen H., Cox E., Bjerg P. 2007. Temperature dependence of anaerobic TCE-dechlorination in a highly enriched *Dehalococcoides*-containing culture. *Water Res.*, vol. 41, pp. 355-364.

- FRTR, 2015. Decision support tools (DST). Federal Remediation Technologies Roundtable, USA. 150408: <http://www.frtr.gov/decisionsupport/>
- Futagami T., Goto M., Furukawa K., 2014. Genetic system of organohalide-respiring bacteria. *In: Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve*. Eds: Nojiri, Tsuda, Fukuda, Kamagata. Springer.
- Gossett J., Zindler S., 1997. Microbial aspects relevant to natural attenuation of chlorinated ethenes. *Proceedings of the Symposium on Natural Attenuation of Chlorinated Organics in Ground Water*. pp. 12-15. EPA/540/R-97/504.
- Griffin B., Tiedje J., Löffler F., 2004. Anaerobic microbial reductive dechlorination of tetrachloroethene to predominately *trans*-1,2-dichloroethene. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 16, pp. 4300-4303.
- Grosterm A., Edwards E., 2006. Growth of *Dehalobacter* and *Dehalococcoides* spp. during degradation of chlorinated ethanes. *AEM*, vol. 72, no. 1, pp. 428–436.
- Grosterm A., Edwards E., 2006b. Characterization of a *Dehalobacter* coculture that dechlorinates 1,2-dichloroethane to ethene and identification of the putative reductive Dehalogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 9, pp. 2684-2693.
- Hallbeck L., 2016. Muntlig information erhållen av SGI från L. Hallbeck, Microbial Analytics Sweden AB, 20160316.
- Hammer S., 2011. Enhanced reductive dechlorination to treat PCE and TCE in a deep gravel aquifer. SLR International Corp., USA. 150316: <http://www.esaa-events.com/proceedings/remtech/2011/pdf/11-Hammer.pdf>
- He J., Ritalahti K., Yang K., Koenigsberg S., Löffler F., 2003. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature*, vol. 424, pp. 62-65.
- He J., Holmes V., Lee P., Alvarez-Cohen L., 2007. Influence of vitamin B12 and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 9, pp. 2847-2853.
- Hill D., MacFabe S., Vogan J., Duchene M., Mueller J., 2004. *In situ* remediation with solid organic substrate and ZVI. RTDF. *Permeable Reactive Barriers (PRB) Action Team Meeting Albuquerque, New Mexico, October 26, 2004*. 150422: <http://www.rtdf.org/public/perm-barr/minutes/102704/pdf/hill.pdf>
- Himmelheber D., Huges J., 2014. *In situ* biotransformation of contaminated sediments. pp. 265-303. *In Processes, Assessment and Remediation of Contaminated Sediments*, Ed. D. Reible.
- Holmes V., He J., Lee P., Alvarez-Cohen L., 2006. Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes. *Appl Environ Microbiol.*, vol. 72, no. 9, pp. 5877-5883.
- Hug L., 2012. A metagenome-based examination of dechlorinating enrichment cultures: *Dehalococcoides* and the role of the non-dechlorinating microorganisms. Thesis, University of Toronto. 150413: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/32742/3/Hug_Laura_A_201206_PhD_thesis.pdf
- Hug L., Maphosa F., Leys D., Löffler F., Smidt H., Edwards E., Adrian L., 2013. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, vol. 368, no. 1616.

- Hug L., Edvards E., Vrionis H., Major D., 2013b. Research needs for bioaugmentation. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H., Eds. Springer NY. pp. 333-361.
- Huling S., Pivetz B., 2006. In-Situ chemical oxidation. US EPA Engineering Issue Paper EPA/600/R-06/072. 151203: <https://clu-in.org/download/contaminantfocus/pcb/ISCO-600R06072.pdf>
- InfoScience, 2015. Design tool for estimation of buffer requirement for enhanced reductive dechlorination of chlorinated solvents in groundwater. 150616: <http://infoscience.epfl.ch/record/135054> http://infoscience.epfl.ch/record/135054/files/BUCHLORAC_17.08.08_submitted.zip
- ITRC, 2005. Overview of *In Situ* bioremediation of chlorinated ethene DNAPL source zones. Prepared by The Interstate Technology & Regulatory Council, USA. 151028: <http://www.itrcweb.org/GuidanceDocuments/BioDNAPL-1.pdf>
- ITRC, 2008. *In situ* bioremediation of chlorinated ethene – DNAPL source zones. Web Seminar 2008. 150414: http://www.clu-in.org/conf/itrc/bioDNAPL_090908/checkin_step1.cfm
- ITRC, 2008b. *In situ* bioremediation of chlorinated ethene: DNAPL source zones. BioDNAPL-3. Prepared by the Bioremediation of DNAPLs Team. Interstate Technology & Regulatory Council, USA. 160314: <http://www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=12>
- ITRC, 2011. Quantitative Polymerase Chain Reaction. EMD Team Fact Sheet - November 2011. Interstate Technology Regulatory Council. 150320: http://www.itrcweb.org/documents/team_emd/qPCR_Fact_Sheet.pdf
- Jansson J., Tas N., 2014. The microbial ecology of permafrost. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12, pp. 414-425.
- Jennings L., Giddings C., Gossett J., Spain J., 2013. Bioaugmentation for aerobic degradation of *cis*-dichloroethene. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H. Eds. Springer NY.
- Jeong H., Hayes K., 2007. Reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene by Mackinawite (FeS) in the presence of metals: Reaction rates. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 18, pp. 6390-6396.
- Jin Y., Mattes T., 2011. Assessment and modification of degenerate qPCR primers that amplify functional genes from etheneotrophs and vinyl chloride-assimilators. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 53, pp. 576-580. 151127: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2011.03144.x/pdf>
- Johnson D., Lee P., Holmes V., Fortin A., Alvarez-Cohen L., 2005. Transcriptional expression of the *tceA* gene in a *Dehalococcoides*-containing microbial enrichment. *Appl., Environ. Microbiol.*, pp. 7145-7151.
- Johnson D., 2007. Functional gene and whole-genome expression analysis of *Dehalococcoides* bacteria. Dissertation, Univ. California. UMI: 3306182.
- Karant N., Deo P., Veenanadig N., 2010. Microbial production of biosurfactants and their importance. 150805: <http://eprints.iisc.ernet.in/1543/1/currscid.pdf>
- Kean J., Graves D., Lodato M., 2002. Enhanced reductive dechlorination and the relationship between *cis*-1,2-DCE accumulation and methanogenesis. 150512: http://www.drycleancoalition.org/download/enhanced_reductive_dechlor.pdf

- Keijzer T., van Gool M., 2007. SKB Cahier: ISCO In-situ chemical oxidation. 151203: [http://www.soilpedia.nl/Bikiwiki%20documenten/SKB%20Cahiers/ISCO%20%20In%20situ%20chemische%20oxidatie%20\(Engels\).pdf](http://www.soilpedia.nl/Bikiwiki%20documenten/SKB%20Cahiers/ISCO%20%20In%20situ%20chemische%20oxidatie%20(Engels).pdf)
- Keijzer T., van Gaans P., de Weert J., Krupanek J., Kalisz M., Marek J., Sutton N., 2012. Methodologies for smart coupling of remediation technologies that are considered smart with respect to cost-effectiveness and sustainable restoration of biogeochemical soil functions. Deliverable D2.8 within EU-project UPSOIL. Project co-funded by the EC within the Seventh Framework Programme (2009-2012). 151203: http://www.upsoil.eu/images/NaszePliki/member/Documents/USOIL_D2.8_Final.pdf
- Koene-Cottaar F., Schraa G., 1998. Anaerobic reduction of ethene to ethane in an enrichment culture. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 25, pp. 251-256. 151124: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00477.x/epdf>
- Krajmalnik-Brown R., Hölscher T., Thomson I., Saunders M., Ritalahti K., Löffler F., 2004. Genetic identification of a putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 10, pp. 6347-6351.
- Krug T., Cox E., Major D., Harkness M., 2013. Economics and valuation of bioaugmentation. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H., Eds. Springer NY. pp. 313-332.
- Kyung D., Sihn Y., Kim S., Bae S., Amin M.-T., Alazba A.-A., Lee W., 2016. Synergistic effect of nano-sized mackinawite with cyano-cobalamin in cement slurries for reductive dechlorination of tetrachloroethylene. *J. Haz. Mat.*, vol. 311, pp. 1-10.
- Kästner M., Fischer A., Nijenhuis I., Geyer R., Stelzer N., Bombach P., Tebbe C., Richnow H., 2006. Assessment of microbial *In Situ* activity in contaminated aquifers. *Engineering in Life Sciences. Special Issue: ISEB/ESEB/JSEB Conference in Leipzig*. vol. 6, no. 3, pp. 234-251.
- Lacinova L., Kvapil P., Cernik M., 2012. A field comparison of two reductive dechlorination (zero-valent iron and lactate) methods. *Environ. Technol.*, vol. 33, no. 7, pp. 741-749.
- Larsson L., 2009. Naturlig självrening av klorerade alifater – vägledning. SGI Varia 601. Statens geotekniska institut. 151111: <http://www.swedgeo.se/globalassets/publikationer/varia/pdf/sgi-v601.pdf>
- Larsson L., Lind B., 2004. Naturlig självrening av petroleumförorenade markområden – Vägledning. SGI Varia 541-1. Statens geotekniska institut. 160622: <http://www.swedgeo.se/globalassets/publikationer/varia/pdf/sgi-v541-1.pdf>
- Larsson L., Stubdrup O., Branzén H., Davidsson L., 2014. Tillsats av mikroorganismer och kolkälla i områden förorenade med klorerade lösningsmedel. Erfarenheter och rekommendationer. SGI Publikation 10. Statens geotekniska institut. 151111: <http://www.swedgeo.se/globalassets/publikationer/sgi-publikation/sgi-p10.pdf>
- Lee P., Cheng D., Hu P., West K., Dick G., Brodie E., Andersen G., Zinder S., He J., Alvarez-Cohen L., 2011. Comparative genomics of two newly isolated *Dehalococcoides* strains and an enrichment using a genus microarray. *The ISME Journal*, vol. 5, pp. 1014-1024. International Society for Microbial Ecology.
- Li J., 2012. Adaptation of a dechlorinating culture, KB-1, to acidic environments. Thesis, Master of Applied Science, Dept. Chem. Eng. Univ. of Toronto. 150413: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/33289/1/li_yixuan_201211_MASc_thesis.pdf

- Li Y., Li B., Wang C., Fan J., Sun H., 2014. Aerobic degradation of trichloroethylene by co-metabolism using phenol and gasoline as growth substrates. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, pp. 9134-9148.
- Länsstyrelsen, 2002. Inventering av förorenade områden. Kemtvättar i Kronobergs län. Länsstyrelsen i Kronobergs län. Meddelande 2002:36. 151222: <http://www.ebhportalen.se/ebh/Sv/Inventeringsrapporter/Kemtv%C3%A4ttar%20i%20Kronobergs%20l%C3%A4n%202005.pdf>
- Länsstyrelsen, 2004. Inventering av förorenad mark. Kemtvätt. Länsstyrelsen i Skåne län. 151222: http://www.lansstyrelsen.se/skane/SiteCollectionDocuments/sv/publikationer/2004/MIFOinventering_fas_1__Kemtvattar1.pdf
- Lu X., Wilson J., Kampbell D., 2006. Relationship between *Dehalococcoides* DNA in ground water and rates of reductive dechlorination at field scale. *Water Res.*, vol. 40, no. 16, pp. 3131-3140.
- Lu X., Wilson J., Kampbell D., 2009. Comparison of an assay for *Dehalococcoides* DNA and a microcosm study in predicting reductive dechlorination of chlorinated ethenes in the field. *Environ. Pollut.*, vol. 157, pp. 809-815.
- Lyon D., Vogel T., 2013. Bioaugmentation for groundwater remediation: An overview. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*. Stroo H., Leeson A., Ward H., Eds. Springer NY. pp. 1-37.
- Löffler F., Sun Q., Li J., Tiedje J., 2000. 16S rRNA Gene-based detection of Tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 4, pp. 1369-1374.
- Löffler F., Yan J., Ritalahti K., Adrian L., Edwards E., Konstantinidis K., Muller J., Fullerton H., Zinder S., Spormann A., 2013. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Systematic Evolutionary Microbiol.*, no. 63, pp. 625-635.
- Löffler F., Ritalahti K., Zinder S., 2013b. *Dehalococcoides* and reductive dechlorination of chlorinated solvents. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H. Eds. Springer NY.
- Magnuson J., Stern R., Gossett J., Zinder S., Burris D., 1998. Reductive dehalogenation of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microb.*, vol. 64, pp. 1270-1275.
- Manchester M., Hug L., Zarek M., Zila A., Edwards E., 2012. Discovery of a trans-dichloroethene-respiring *Dehalogenimonas* species in the 1,1,2,2-tetrachloroethane-dechlorinating WBC-2 consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 15, pp. 5280-5287. 160404: <http://aem.asm.org/content/78/15/5280.full.pdf>
- Mars J.F., Lieten S., 2011. Case Utrecht: Bio-washing Machine. CityChlor. Workshop 19 October 2011. 151008: http://www.citychlor.eu/sites/default/files/8_Jan_Frank_Mars_and_Shakti_Lieten_Bio-washing_machine_at_Utrecht.pdf
- Mattes T., Alexander A., Richardson P., Munk C., Han C., Stothard P., Coleman N., 2008. The genome of *Polaromonas* sp. Strain JS666: Insights into the evolution of a hydrocarbon- and xenobiotic-degrading bacterium, and features of relevance to biotechnology. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 20, pp. 6405-6416.

- Maymó-Gatell X., Anguish T., Zinder S., 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 7, pp. 3108-3113.
- Maymó-Gatell X., Chien Y., Gossett J., Zinder S., 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, vol. 276, no. 5318, pp. 1568-1571.
- Maymó-Gatell X., Anguish T., Zinder S., 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2- dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 65, no. 7, pp. 3108-3113. 150504: <http://aem.asm.org/content/65/7/3108.full>
- McLean J., Ervin J., Zhou J., Sorensen D., Dupont R., 2015. Biostimulation and bioaugmentation to enhance reductive dechlorination of TCE in a long-term flow through column study. *Groundwater Monitoring & Remediation*, vol. 35, no. 3, pp. 76-88.
- Meckenstock R., Elsner M., Griebler C., Lueders T., Stumpp C., Aamand J., Agathos S Albrechtsen H.-J., Bastiaens L., Bjerg P., Boon N., Dejonghe W., Huang W., Schmidt S., Smolders E., Sørensen S., Springael D., van Breukelen B., 2015. Biodegradation: Updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, pp. 7073-7081. 151016: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.est.5b00715>
- MGP, 2015. Lower and Upper Explosive Limits for flammable gases and vapors (LEL/UEL). *Matheson Gas Products*. 150512: [https://www.mathesongas.com/pdfs/products/Lower-\(LEL\)-&-Upper-\(UEL\)-Explosive-Limits-.pdf](https://www.mathesongas.com/pdfs/products/Lower-(LEL)-&-Upper-(UEL)-Explosive-Limits-.pdf)
- MI, 2015. QuantArray-Chlor. Microbial Insights, Inc., USA. 150415: <http://www.microbe.com/quantarray-chlor/>
- MI, 2015b. CENSUS – Cometabolism of chlorinated ethenes. Microbial Insights, Inc. USA. 150402: <http://www.microbe.com/wp-content/uploads/2015/01/chloroethenes.pdf>
- MI, 2015c. CENSUS – Reductive dechlorination. Microbial Insights, Inc. USA. 150402: <http://www.microbe.com/wp-content/uploads/2015/01/census-rd-6.pdf>
- MI, 2015e. How do Bio-Trap® samplers work? Microbial Insights Inc. USA. 151008: <http://www.microbe.com/bio-trap-samplers/>
<http://www.microbe.com/wp-content/uploads/2015/01/biotrap-3.pdf>
- MI, 2015f. Evaluation of biostimulation using CENSUS qPCR quantification of *Dehalococcoides* and vinyl chloride reductase genes. 151008: <http://www.microbe.com/census-reductive-dechlorination-case-study/>
- Middeldorp P., Langenhoff A., Gerritse J., Rijnaarts H., 2002. *In situ* biological soil remediation techniques. In: *Biotechnology for the Environment: Soil Remediation*. Agathos and Reineke eds.
- Mohsen M., Lacko P., Ayyaswami A., 2016. Numerical simulation of substrate-limited degradation. *Remediation J.*, vol. 26, no. 2, pp. 73-86. 160415: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rem.21459/epdf>
- Molofsky L., Connor J., Wylie A., Wagner T., Farhat S., 2013. Evaluation of methane sources in groundwater in Northeastern Pennsylvania. *Ground Water*, vol. 51, no. 3, pp. 333–349. 150512: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gwat.12056/pdf>
- MPCA, 2006. Guidelines. Natural attenuation of chlorinated solvents in ground water. Minnesota Pollution Control Agency, Site Remediation Section. Rev. 2006. 150429:

<http://www.pca.state.mn.us/publications/c-s4-05.pdf> alternativt <http://www.pca.state.mn.us/index.php/view-document.html?gid=6457>

Mueller J., Karachalios A., Fowler T., 2014. Controlling methane at ERD and ISCR applications. *Pollution Engineering*, October 2014, pp. 24-29. Ytterligare info: <http://www.provectusenvironmental.com/technologies/provect-ir/>

Mueller J., Booth G., 2016. Managing excessive Methanogenesis during ERD/ISCR remedial action. *Remediation J.*, vol. 26, no. 3, pp. 53-71. 160822: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rem.21469/epdf>

Müller J., Rosner B., von Abendroth G., Meshluham-Simon G., McCarty P., Spormann A., 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, pp. 4880-4888.

Müller V., 2001. Bacterial fermentation. *Encyclopedia of life science*. Nature Publ. Group. 151127: <http://web.oranim.ac.il/courses/microbiology/Bacterial%20Fermentation%20Nature.pdf>

NAVFAC, 2011. Guidance Protocol. Application of nucleic acid-based tools for monitoring monitored natural attenuation (MNA), biostimulation, and bioaugmentation at chlorinated solvent sites. Environmental Restoration Project ER-0518. Contract Report CR-11-028-ENV. 150320: <http://www.clu-in.org/download/techfocus/biochlor/Bio-MNA-ER-200518-Guidance.pdf>

Nishino S., Shin K., Gossett J., Spain J., 2013. Cytochrome P450 initiates degradation of *cis*-dichloroethene by *Polaromonas* sp. Strain JS666. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 7, pp. 2263-2272.

Nordberg U., 2006. Biogas – Nuläge och framtida potential. Rapport 993. Värmeforsk.

NSD, 2013. Superbakterie sanerar gifter. 151008: <http://www.nsd.se/nyheter/boden/superbakterie-sanerar-gifter-7854693.aspx>

Ohio, 2012. How well do you know your water well? *Ohio Department of Health, Ohio Department of Natural Resources – Division of Oil & Gas Resources Management and Division of Soil & Water Resources, Ohio Environmental Protection Agency*. 150512: <http://epa.ohio.gov/Portals/0/general%20pdfs/HowWellDoYouKnowYourWaterWell.pdf>

Ohio, 2013. Methane in Ohio private water wells. *Ohio Department of Health Bureau of Environmental Health. 2013 Midwest Workshop*. 150512: http://www.odh.ohio.gov/~media/ODH/ASSETS/Files/eh/water/powerpoints/methane_naturalgas_pdf

Popat S., Deshusses M., 2011. Kinetics and inhibition of reductive dechlorination of trichloroethene, *cis*-1,2-dichloroethene and vinyl chloride in a continuously fed anaerobic biofilm reactor. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 1569-1578. 150320 :<http://deshusses.pratt.duke.edu/files/deshusses/u31/pdf/ja84.pdf>

Puigserver D., Nieto J., Grifoll M., Vila J., Cortes A., Viladevall M., Parker B., Carmona J., 2016. Temporal hydrochemical and microbial variations in microcosm experiments from sites contaminated with chloromethanes under biostimulation with lactic acid. *Bioremediation Journal*, vol. 20, no. 1, pp. 54-70.

Quinn J., O'hara S., Krug T., Geiger C., Clausen C., Holdsworth T., Yoon S., 2005. Emulsified zero-valent iron treatment of chlorinated solvent DNAPL source areas. *U.S. EPA Workshop on Nanotechnology for Site Remediation* Washington, DC. 150421: http://www.frtr.gov/pdf/meetings/h--quinn_09jun04.pdf

- Reinhold A., Westermann M., Seifert J., von Bergen M., Schubert T., Diekert G., 2012. Impact of vitamin B12 on formation of the tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Desulfitobacterium hafniense* Strain Y51. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 22 pp. 8025-8032.
- Robinson C., Barry D., 2009. Design tool for estimation of buffer requirement for enhanced reductive dechlorination of chlorinated solvents in groundwater (BUCHLORAC). *Environ. Modeling & Software.*, vol. 24, pp. 1332-1338. 150615: <http://infoscience.epfl.ch/record/135054>
- Rupakula A., Kruse T., Boeren S., Holliger C., Smidt H., Maillard J., 2013. The restricted metabolism of the obligate organohalide respiring bacterium *Dehalobacter restrictus*: lessons from tiered functional genomics. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, vol. 368, no. 1616, pp. 1-16.
- Ryoo D., Shim H., Canada K., Barbieri P., Wood T., 2000. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature Biotechnology*, vol. 18, pp. 775-778.
- Saharan B., Sahu R., Sharma D., 2011. A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, vol. 2011: GEBJ-29, accepted version, Nov 7, 2011. 150805: <http://astonjournals.com/manuscripts/Accepted/GEBJ-29acc7-11-11.pdf>
- Scheutz C., Durant N., Dennis P., Heisterberg Hansen M., Jørgensen T., Jakobsen R., Cox E., Bjerg P. 2008. Concurrent ethene generation and growth of Dehalococcoides containing vinyl chloride reductive dehalogenase genes during an enhanced reductive dechlorination field demonstration. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 42, No. 24, pp 9302–9309.
- Semprini L., 2013. Bioaugmentation for the *in situ* aerobic cometabolism of chlorinated solvents. *In: Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H. Eds. Springer, NY.
- SERDP/ESTCP, 2013. Development of design tools for planning aqueous amendment injection systems. ER-200626. Strategic Environmental Research and Development Program (SERDP) and Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP). US EPA and US DOE. 150616: <https://www.serdp-estcp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Contaminated-Groundwater/ER-200626/ER-200626>
- SERDP/ESTCP, 2015. Loading rates and impacts of substrate delivery for enhanced anaerobic bioremediation. Strategic Environmental Research and Development Program (SERDP) and Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP). US EPA and US DOE. 150616: <https://www.serdp-estcp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Contaminated-Groundwater/ER-200627>
- SGF, 2011. Stimulerad reaktiv deklorering. En praktisk handledning. Svenska Geotekniska Föreningen. SGF Rapport 1:2011.
- SGF, 2012. Klorerade lösningsmedel i mark och grundvatten – Att tänka på inför provtagning och upphandling. Svenska Geotekniska Föreningen. SGF Rapport 2:2011.
- Shani N., 2012. Assessing the bacterial ecology of organohalide respiration for the design of bioremediation strategies. Thesis 5379. École Polytechnique federale de Lausanne, Suisse. 150413: http://infoscience.epfl.ch/record/180206/files/EPFL_TH5379.pdf
- Shim H., Ryoo D., Barbieri P., Wood TK., 2001. Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes, and vinyl chloride by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 56, no 1-2, pp. 265-269.

- Simon J., 2015. Editor's perspective - An *In Situ* revelation: First retard migration, then treat. *Remediation J.*, vol. 25, no. 2, pp. 1-15. 150422: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rem.21420/epdf>
- Sirem, 2015. Environmental molecular testing. Sirem Lab, Canada. 150416: <http://www.sirem-lab.com/images/PDF/gene-trac.pdf>
- Sirem, 2015b. KB-1® Primer. SiREM Lab, Ontario, Canada. 151109: <http://www.sirem-lab.com/images/PDF/kb-1-primer.pdf>
- 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.
- Steffan R., Vainberg S., 2013. Production and handling of *Dehalococcoides* bioaugmentation cultures. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H. Eds., Springer, NY.
- Stroo H., Major D., Steffan R., Koenigsberg S., Ward H., 2013. Bioaugmentation with *Dehalococcoides*: A decision guide. In: *Bioaugmentation for groundwater remediation*, Stroo H., Leeson A., Ward H., Eds. Springer, NY. pp. 117-140.
- Sublette K., Davis G., Ogles D., Baldwin B., Biernacki A., 2011. Applications of Bio-traps. Workshop, Oakland, Cal., USA. Sublette Consulting Inc. USA. 151016: http://www.advancedtools.us/downloads/pdf/workshops/Oakland_CA/Module_9_Sublette.pdf
- Sung Y., Ritalahti K., Apkarian R., Löffler F., 2006. Quantitative PCR Confirms Purity of Strain GT, a novel Trichloroethene-to-Ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 3, pp. 1980-1987.
- Sung Y., Fletcher K., Ritalahti K., Apkarian R., Ramos-Hernandez N., Sanford R., Mesbah N., Löffler F., 2006b. *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 4, pp. 2775-2882. 150623: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1448980/pdf/2893-05.pdf>
- Suyama A., Yamashita M., Yoshino S., Furukawa K., 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. Strain Y51. *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 13, pp. 3419-3425.
- Sörensen J., Persson M., 2008. Contaminant mass balance, fluxes and risk assessment of a clayey till site undergoing anaerobic dechlorination. Master Thesis. Institutionen för Kemiteknik, Lunds Tekniska Högskola. 160212: <http://www.chemeng.lth.se/exjobb/E523.pdf>
- TBT, 2012. A Toolbox of Groundwater Technologies. True Blue Technologies, Inc. 150616: http://www.trueblueclean.com/support/library/cat_view/39-ph-buffering.html
- Tobiszewski M., Namieśnik J., 2012. Abiotic degradation of chlorinated ethanes and ethenes in water. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 19, pp.1994-2006. 150617: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3390699/pdf/11356_2012_Article_764.pdf
- Törneman N., Karlsson L., Englov P., Cox E., Durant N., Azziz C., Dall-Jepsen J., Højbjerg Jørgensen T., 2009. Övervakad naturlig självrening som åtgärdsstrategi på förorenade områden. Kunskapsprogrammet Hållbar Sanering. Naturvårdsverket. Rapport 5893.
- UK Environment Agency, 2003. An illustrated handbook of DNAPL transport and fate in the subsurface. R&D Publication 133. 151103: http://www.clu-in.org/conf/itrc/dnaplpa/dnapl_handbook_final.pdf

- Uniprot, 2015. *Dehalococcoides mccartyi* (strain ATCC BAA-2266 / KCTC 15142 / 195) (*Dehalococcoides ethenogenes* (strain 195)). The Universal Protein Resource. *The UniProt Consortium, a collaboration between the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), the SIB Swiss Institute of Bioinformatics and the Protein Information Resource (PIR)*. 150317: <http://www.uniprot.org/taxonomy/243164>
- US DOE, 2006. Natural and enhanced attenuation of chlorinated solvents using RT3D. Prepared by Pacific Northwest National Laboratory. Publication: PNNL-15937. 150505: http://www.pnl.gov/main/publications/external/technical_reports/PNNL-15937.pdf
- US DOE, 2006b. Mass balance: A key to advancing monitored and enhanced attenuation for chlorinated solvents. Prepared for the U.S. Department of Energy by Westinghouse Savannah River Company. WSRC-STI-2006-00082, Rev.0. 150410: <http://sti.srs.gov/fulltext/WSRC-STI-2006-00082.pdf>
- US DOE, 2006c. RT3D reaction modules for natural and enhanced attenuation of chloroethanes, chloroethenes, chloromethanes, and daughter products. *Prepared by Pacific Northwest National Laboratory*. Publication: PNNL-15938. 150323: http://www.pnl.gov/main/publications/external/technical_reports/PNNL-15938.pdf
- US EPA, 1998. Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington DC, EPA/600/R-98/128. 150429: <https://clu-in.org/download/remed/protocol.pdf>
- 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.
- US EPA, 2013. Introduction to in situ bioremediation of groundwater. EPA 542-R-13-018. US Environmental Agency. 150618: http://epa.gov/tio/download/remed/introductiontoinsitubioremediationofgroundwater_dec2013.pdf
- US EPA, 2013b. Field measurement of oxidation-reduction potential (ORP). Operating procedure. SESDPROC-113-R1. US Environmental Agency. 150618: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/Field-Measurement-of-ORP.pdf>
- US EPA, 2015. Bioremediation. Anaerobic Bioremediation (Direct). Clean-Up Information, US Environmental protection Agency. 150415: [http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Anaerobic_Bioremediation_\(Direct\)/](http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Anaerobic_Bioremediation_(Direct)/)
- US EPA, 2015b. Clean-up information. US Environmental Protection Agency. Technology Innovation and Field Services Division. 150408: <http://clu-in.org/>
- USGS, 2000. Biodegradation of chlorinated ethenes at a Karst Site in Middle Tennessee. *Water Resources Investigations Report 99-4285. United States Geological Survey*. 150507: <http://pubs.usgs.gov/wri/wri994285/coverforpdf.pdf>
- USGS, 2007. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes under oxidation-reduction conditions and potentiometric surfaces in two trichloroethene-contaminated zones at the Double Eagle and Fourth Street Superfund sites in Oklahoma City, Oklahoma. Scientific Investigations Report 2004–5050, version 2. U.S. Department of the Interior. U.S. Geological Survey. 150429: <http://pubs.usgs.gov/sir/2004/5050/pdf/2004-5050.pdf>

- USGS, 2015. Biodegradation of chlorinated ethenes at a Karst Site in Middle Tennessee. United States Geological Survey. 150402: <http://pubs.usgs.gov/wri/wri994285/text/chlorinated.html>
- USGS, 2015b. PHREEQC welcome page. United States Geological Survey. 150615: http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/GWC_coupled/phreeqc/
- USGS, 2015c. Definitions. 150504: <http://toxics.usgs.gov/definitions/>
- Wagner A., Adrian L., Kleinstaub S., Andreesen J., Lechner U., 2009. Transcription analysis of genes encoding homologues of reductive dehalogenases in “*Dehalococcoides*” sp. strain CBDB1 by using terminal restriction fragment length polymorphism and quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 7, pp. 1876-1884.
- Waller A., 2009. Molecular investigation of chloroethene reductive dehalogenation by the mixed microbial community KB1. *Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Dept of Chem. Eng. and Appl. Chem., University of Toronto.* 151109: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/19106/1/Waller_Alison_S_200911_PhD_thesis.pdf
- van Bommel M., van der Werf A., Henssen M., van Ras N., 2011. Ten years of experience with the new TCE-concept for Bioaugmentation in Full-scale Applications. *Renare Mark, Spring meeting 13-14 April 2011, Sundsvall, Sweden.* 160622: http://www.renaremark.se/filarkiv/vm2011/abstracts/E_10%20years%20of%20experience%20with%20full%20scale%20bioaugmentation.pdf http://www.renaremark.se/filarkiv/vm2011/Presentationer/E2_Maurice_Henssen.pdf
- 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. 151014: <http://aem.asm.org/content/76/3/843.full.pdf>
- Van Nooten, T., Springael, D., Bastiaens, L., 2010. Microbial community characterization in a pilot-scale permeable reactive iron barrier. *Environ. Eng. Sci.*, vol. 27, pp. 287.
- vanWalt, 2012. Reporting redox (ORP reporting). Technical information. 150618: <https://www.vanwalt.com/pdf/information-sheets/RedoxReporting.pdf>
- Velimirovic M. Simons Q, Bastiaens L., 2015. Use of CAH-degrading bacteria as test-organisms for evaluating the impact of fine zerovalent iron particles on the anaerobic subsurface environment. *Chemosphere.*, vol. 134, pp. 338-345.
- Wiki, 2015. Reduction potential. 150618: https://en.wikipedia.org/wiki/Reduction_potential
- Wrenn B., 2004. Enhanced reductive dechlorination through biological interactions with zero-valent iron. *Environmental Engineering Science Program Civil Engineering Department Washington University St. Louis, MO.* FRTR Meeting 9 June 2004. 150429: http://www.frtr.gov/pdf/meetings/j--wrenn_09jun04.pdf
- Vroblecky D., Chapelle F., 2000. Hydrogen measurements and redox dynamics in groundwater systems. I *Workshop on Monitoring Oxidation-Reduction Processes for Ground-water Restoration Workshop Summary.* Dallas, Texas - April 25-27, 2000. EPA/600/R-02/002. pp. 19-20. 151021: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/10003Z26.PDF?Dockey=10003Z26.PDF>
- Wymore R., Hope Lee M., Keener W., Miller A., Colwell F., Watwood M., Sorenson Jr K., 2007. Field evidence for intrinsic aerobic chlorinated ethene cometabolism by Methanotrophs expressing soluble methane monooxygenase. *Biorem. J.*, vol. 11, no. 3, pp. 125-139.

- Xiao R., 2014. Development and evaluation of an enrichment culture for reductive dechlorination of tetrachloroethylene under low pH conditions. *A Thesis Presented to the Graduate School of Clemson University, USA*. 150415: http://tigerprints.clemson.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2847&context=all_theses
- Yan J., Rash B., Rainey F., Moe W., 2009. Detection and quantification of *Dehalogenimonas* and “*Dehalococcoides*” populations via PCR-based protocols targeting 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 23, pp. 7560-7564.
- Yan J., Ritalahti K., Wagner D., Löffler F., 2012. Unexpected specificity of interspecies co-bamide transfer from *Geobacter* spp. to organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 18, pp. 6630-6636.
- Yan J., Im J., Yang Y., Löffler F., 2013. Guided cobalamin biosynthesis supports *Dehalococcoides mccartyi* reductive dechlorination activity. *Phil. Trans. R. Soc., Biol. Sci.*, March 2013, 368 pp.
- Yang Yi, 2012. Exploring anaerobic reductive dechlorination at low pH environments. *Masters Theses. University of Tennessee, Knoxville, USA*. 150415: http://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2497&context=utk_gradthes
- Zaa C., 2008. Dechlorinating and iron reducing bacteria distribution in a TCE-contaminated aquifer. *MSc Thesis. Utah State University*. 150623: <http://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1040&context=etd>
- Zaa C., McLean J., Dupont R., Norton J., Sorensen D., 2010. Dechlorinating and iron reducing bacteria distribution in a TCE-contaminated aquifer. *GWM&R*, vol. 30, no. 1, pp 44-55. 150623: <http://info.ngwa.org/gwol/pdf/100284159.pdf>
- Zhang J., Joslyn A., Chiu P. 2006. 1,1-Dichloroethene as a predominant intermediate of microbial Trichloroethene reduction. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1830-1836.
- Zhang Y., Tay J., 2015. Toxic and inhibitory effects of trichloroethylene aerobic co-metabolism on phenol-grown aerobic granules. *J. Haz. Mat.*, vol. 286, pp. 204-210.
- Zhao S., Ding C., He J., 2015. Detoxification of 1,1,2-trichloroethane to ethene by *Desulfitobacterium* and identification of its functional reductase gene. *PLOS ONE*, April 2, 2015. pp. 1-13. 150623: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383557/pdf/pone.0119507.pdf>
- Åtgärdsportalen, 2015. Klorerade alifater. 150408: <http://www.atgardsportalen.se/fororeningar/klorerade-alifater>



Statens geotekniska institut

Postadress: 581 93 Linköping

Tel: 013-20 18 00

E-post: sgi@swedgeo.se

www.swedgeo.se
