

## **Biologisk nedbrydning af klorerede opløsningsmidler**

Projekter gennemført ved Skrydstrup Specialdepot

**Aamand, Jens; Broholm, Kim**

*Publication date:*  
1991

*Document Version*  
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*

Aamand, J., & Broholm, K. (1991). Biologisk nedbrydning af klorerede opløsningsmidler: Projekter gennemført ved Skrydstrup Specialdepot. (Lossepladsprojektet. Rapport; Nr. A1).

## **DTU Library**

Technical Information Center of Denmark

---

### **General rights**

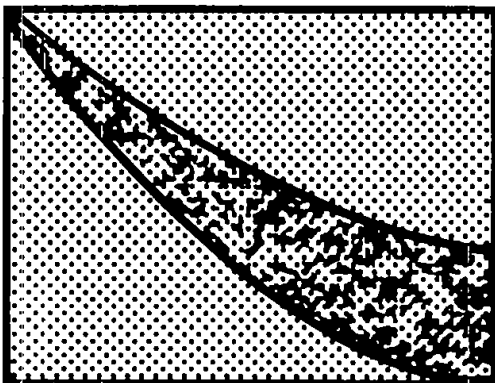
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

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

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

**Redigeret af:**

**Jens Aamand, Afdeling for Generel Mikrobiologi, KU  
Kim Broholm, Laboratoriet for teknisk Hygiejne, DTH**



**BIOLOGISK NEDBRYDNING AF  
KLOREDE OPLØSNINGSMIDLER -  
Projekter gennemført ved  
Skrydstrup Specialdepot**

**RAPPORT A1    NOVEMBER 1991  
LOSSEPLADSPROJEKTET**

## FORORD

Denne rapport samler resultaterne fra de afværge-udviklingsprojekter under lossepladsprojektet, der er gennemført ved Skrydstrup specialdepot, Vojens kommune, Sønderjyllands amtskommune.

Formålet har været at præsentere de vigtige resultater og erfaringer, der er opnået med biologisk nedbrydning af klorerede alifater ved laboratorieforsøg, pilotanlæg og ved midlertidige depoter ved Skrydstrup. Rapporten vil forhåbentlig kunne bruges ved en fremtidig vurdering af mulighederne for at gennemføre mikrobiologisk rensning af jord/grundvand forurenet med klorerede alifater.

En række metodebeskrivelser, erfaringer og resultater har ikke fundet plads i rapporten. For yderligere oplysninger henvises til de rapporter og artikler, der er udkommet i forbindelse med de enkelte projekter (se Bilag).

Laboratorieforsøgene beskrevet i kapitel 2, 3 og 4 er udført af Jens Aamand (i dag ansat på Vandkvalitetsinstituttet) og Jan C. Nielsen (i dag ansat på Christian Hansens Laboratorium) på Afdeling for Generel Mikrobiologi (AGM), Københavns Universitet og af Kim Broholm (i dag ansat på Waterloo Centre for Groundwater research, University of Waterloo, Canada) på Laboratoriet for teknisk Hygiejne (LtH) Danmarks Tekniske Højskole.

Analyser og vurderinger i forbindelse med de to midlertidige depoter, beskrevet i kapitel 5, er varetaget af Bente A. Nyeland, Danmarks Miljøundersøgelser (DMU).

Drift og styring af pilotanlægget til rensning af forurenet vand, beskrevet i kapitel 6, er varetaget af Elin Dichmann Jensen og Jens Nonboe Andersen, Kemp & Lauritzen A/S (K&L).

I forbindelse med denne rapport blev der nedsat en styringsgruppe bestående af Lotte Rahbek (Miljøstyrelsen), Thomas Christensen (Lossepladsprojektet), Neel Strøbæk (Sønderjyllands Amt), Jens Aamand (AGM), Kim Broholm (LtH), Bente Nyeland (DMU), Jens Nonboe Andersen (K&L) og Elin Dichmann Jensen (K&L). Styringsgruppen takkes for kritisk gennemgang af manuskriptet.

Jens Aamand

Kim Broholm

## SAMMENFATNING

Denne rapport indeholder de væsentligste resultater opnået i de udviklingsprojekter vedrørende biologisk nedbrydning af klorerede alifater, der er udført i forbindelse med afværgeforanstaltningerne ved Skrydsstrup specialdepot.

Mulighederne for at gennemføre in-situ aerob biologisk nedbrydning af klorerede alifater blev undersøgt ved laboratorie batch- og søjleforsøg. Forsøgene viste, at det var muligt at opformere en methan-oxiderende biomasse, der var i stand til at nedbryde triklorethylen (TCE) og 1,1,1-triklorethan (1,1,1-TCA) men ikke tetraklorethylen (PCE), Søjleforsøgene afslørede, at stripping som følge af metan og luft tilsætningen var en væsentlig fjernelsesmekanisme i søjler, hvor luften ikke recirkuleredes. Da det er svært at undgå stripping i et fuld-skala anlæg, er det nødvendigt at optimere den biologiske nedbrydning, før metoden kan anvendes i praksis.

Der er gennemført en række batchforsøg med henblik på at undersøge mulighederne for aerob og anaerob nedbrydning af klorerede alifater i grundvand.

I aerobe forsøg, hvor de methan-oxiderende bakterier voksede i grundvand fra Skrydsstrup, blev det vist, at både nedbrydningen af methan og TCE kunne optimeres ved tilsætning af forskellige næringssalte. I modsætning hertil medførte vækst under fravær af spormetallet kobber, at nedbrydningsraten for TCE blev forøget 88 gange. Det er dog uvist, om den naturlige koncentration af kobber i grundvandszonen ved Skrydsstrup vil resultere i kobberbegrænset vækst.

Da grundvandet ved Skrydsstrup indeholder høje koncentrationer af klorerede alifater er der gennemført en række toxicitetsforsøg med både TCE og 1,1,1-TCA overfor en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier. Forsøgene viste, at selv i små koncentrationer inhiberer både TCE og 1,1,1-TCA omsætningen af methan. Omsætningen af methan inhiberedes totalt ved en koncentration af TCE på 13 mg/l men ikke ved en koncentration af 1,1,1-TCA på 103 mg/l. Forsøg har ligeledes vist, at methan inhiberer omsætningen af TCE. Der er opstillet en matematisk model til beskrivelse af omsætningen af methan, klorerede alifater og bakterievækst. Modellen simulerer de observerede nedbrydningsforløb for methan og TCE, men ikke for methan og 1,1,1-TCA.

Det var ikke muligt at opnå nedbrydning af TCE i forsøg hvor methanol blev anvendt som primærsubstrat i stedet for methan. Dette skyldes muligvis at methanol ikke inducere det aktive enzym.

Anaerob nedbrydning af klorerede alifater blev undersøgt i forsøg med materiale fra følgende miljøer: Grundvand fra Skrydsstrup, grundvand fra Mørkhøj Bygade, og methanogent slam fra forskellige renselanlæg. Der blev ikke observeret nogen nedbrydning af PCE eller TCE med grundvand fra Skrydsstrup, hvilket sandsynligvis skyldes, det høje redoxpotentiale i grundvandet. Der er fundet høje koncentrationer af både ilt, nitrat og sulfat i dette grundvandsmagasin. Anaerob nedbrydningen af klorerede alifater kræver et primærsubstrat.

Laboratorieforsøg har vist, at de primærsubstrater, der resulterer i dannelse af hydrogen, medfører den mest effektive nedbrydning af PCE.

Ved Skrydstrup specialdepot er der i 1986 opført to midlertidige depoter, hvor der er deponeret forurenet jord. Det ene depot er forsøgt holdt anaerobt og det andet er forsøgt holdt aerobt. Koncentrationen er klorerede alifater i perkolatet fra de to depoter viser, at der sandsynligvis er sket en anaerob omsætning i begge depoter, idet der er observeret ophobning af diklorethylener og diklorethener. Der er sket et væsentligt fald i koncentrationen af klorerede stoffer i de to depoter. Dette fald kan tilskrives både biologisk nedbrydning og fjernelse ved andre processer (stripning).

Der er etableret et on-site pilot anlæg til aerob biologisk rensning af oppumpet grundvand indeholdende klorerede alifater. Anlægget blev forsøgt optimeret ved at drive det ved forskellige opholdstider. Ved den største opholdstid på omkring 3,5 timer observeredes en nedbrydning af metan på ca. 85% og af TCE på 40%. Omkring 10% af TCE og 1,1,1-TCA blev fjernet ved stripning. Der var ingen nedbrydning af 1,1,1-TCA i filteret. Forsøg med alternerende methantilførsel resulterede ikke i nogen forbedret nedbrydning af TCE.

## SUMMARY

Aamand, J. and K. Broholm (ed.)(1991): Microbial transformations of chlorinated aliphatics. 74 pages.

This report summarizes the most important results obtained in the research projects dealing with biodegradation of chlorinated aliphatics carried out in connection with the remediation scheme carried out at Skrydstrup chemical waste disposal site.

Some laboratory batch and column experiments have been carried out to examine the possibilities of carrying out in-situ biodegradation of chlorinated aliphatics in the unsaturated soil. The experiments showed that it was possible to build up a methane-oxidizing biomass which was able to degrade trichloroethylene (TCE) and 1,1,1-trichloroethane (1,1,1-TCA) but not tetrachloroethylene (PCE). The column experiments revealed that stripping due to the addition of methane and air was a significant removal process in columns without recirculation of the injected air. In practice it is difficult to avoid stripping, which means that the biological processes have to be optimized before the technique will be useful.

Laboratory batch experiments have been carried out to examine the degradation of chlorinated aliphatics in groundwater.

Aerobic degradation experiments showed that the degradation of TCE and methane in the groundwater at Skrydstrup was slow compared to the degradation of TCE and methane in a mineral medium. In opposition to that the degradation rate of TCE was increased 88 times when the bacteria grew in absence of copper. It is unknown whether the natural concentration of copper in the groundwater at Skrydstrup results in copper limited growth or not.

The groundwater at Skrydstrup contains high concentrations of chlorinated aliphatics. Therefore the toxicity of 1,1,1-TCA and TCE towards a mixed culture of methane-oxidizing bacteria was examined in batch experiments. The consumption of methane was inhibited even by small concentrations of 1,1,1-TCA and TCE. A total inhibition of the methane consumption was observed at a TCE concentration of 13 mg/l, whereas a total inhibition was not observed at a 1,1,1-TCA concentration of 103 mg/l. Experiments also showed that the presence of methane inhibited the degradation of TCE. A mathematical model describing the growth of bacteria and the degradation of methane and chlorinated aliphatics is proposed. The model was able to simulate the observed degradation curves for methane and TCE but not for methane and 1,1,1-TCA.

The use of methanol instead of methane as primary substrate for the methane-oxidizing bacteria was examined. The experiments show that methanol did not stimulate the degradation of TCE probably because methanol does not induce methane monooxygenase.

Anaerobic biodegradation of chlorinated aliphatics have been investigated with groundwater from Skrydstrup, groundwater sediment from Mørkhøj Bygade, and methanogenic sludge

from different wastewater treatment plants. No degradation of PCE was observed in the groundwater from Skrydstrup, probably because of the high redoxpotential in this reservoir. The reservoir contain high concentrations of oxygen, nitrate and sulfate. The anaerobic degradation of chlorinated aliphatics depended on the presence of a primary substrate. Laboratory experiments show that the primary substrates resulting in formation of hydrogen sustained the fastest degradation of PCE.

Two temporary disposal sites containing contaminated soil have been established in 1986 at Skrydstrup chemical waste disposal site. One of the sites was kept anaerobic whereas air was allowed to enter the other site. Accumulation of dichloroethanes and dichloroethenes was observed in the leachate from the two sites showing that anaerobic biodegradation had occurred in both sites. A significant amount of the contaminants from both sites has been removed, but it is not possible to decide how much has been removed by biodegradation and how much had been removed by other processes (stripping).

A pilot plant for aerobic on-site biodegradation of chlorinated aliphatics in groundwater has been established at Skrydstrup. The plant was operated with different hydraulic retention times in order to optimize the degradation of the chlorinated aliphatics. At the highest hydraulic retention time of 3.5 hours a degradation of methane of 85 % and of TCE of 40 % was observed. No degradation of 1,1,1-TCA was observed in the plant. About 10% of 1,1,1-TCA and TCE were stripped. The plant was operated with alternating addition of methane to avoid competition between methane and chlorinated aliphatics, but it did not result in an increased degradation of TCE.

## INDHOLDSFORTEGNELSE

|  |    |
|--|----|
| 1. Indledning . . . . .  | 1  |
| (Kim Broholm og Jens Aamand)   |    |
| 1.1 Skrydstrup Specialdepot . . . . .  | 1  |
| 1.2 Klorerede alifater . . . . .   | 3  |
| 1.3 Biologisk nedbrydning af klorerede alifater . . . . .                              | 4  |
| 2. Aerob nedbrydning i forurenede, umættet jord . . . . .                              | 10 |
| (Kim Broholm)  |    |
| 2.1 Forsøgsopstilling . . . . .  | 10 |
| 2.2 Resultater og diskussion . . . . .   | 14 |
| 2.3 Konklusion . . . . .   | 17 |
| 3. Aerob nedbrydning i grundvand . . . . .   | 19 |
| (Jens Aamand, Jan C. Nielsen og Kim Broholm)   |    |
| 3.1 Næringsstoffers betydning for nedbrydningen<br>af triklorethylen . . . . .         | 19 |
| 3.2 Toxiciteten af 1,1,1-TCA og TCE . . . . .  | 27 |
| 3.3 Anvendelse af forskellige primærsubstrater . . . . .                               | 34 |
| 3.4 Nedbrydningskinetik . . . . .  | 37 |
| 4. Mikrobiel nedbrydning af klorerede alifater under<br>anaerobe forhold . . . . .     | 42 |
| (Jens Aamand).   |    |
| 4.1 Metoder . . . . .  | 42 |
| 4.2 Resultater . . . . .   | 43 |
| 4.3 Konklusion . . . . .   | 50 |
| 5. Biologisk nedbrydning i midlertidigt depot: Skrydstrup<br>opsamlingsdepot . . . . . | 52 |
| (Bente Nyeland).   |    |
| 5.1 Etablering af depoterne . . . . .  | 53 |
| 5.2 Anaerobt depot (etape 1) . . . . .   | 54 |
| 5.3 Aerobt depot (etape 2) . . . . .   | 56 |
| 5.4 Konklusion . . . . .   | 59 |



|  |    |
|--|----|
| 6. On-site nedbrydning - oppumpet grundvand . . . . .      | 60 |
| (Jens Andersen og Elin Dichmann Jensen)                    |    |
| 6.1 Indledning . . . . .                                   | 60 |
| 6.2 Vandkvaliteten . . . . .                               | 60 |
| 6.3 On-site anlægget . . . . .                             | 61 |
| 6.4 Forsøgsdrift . . . . .                                 | 63 |
| 6.5 Methanforbrug . . . . .                                | 64 |
| 6.6 Resultater fra forsøg med opholdstiden . . . . .       | 66 |
| 6.7 Resultater fra forsøg med alternerende drift . . . . . | 68 |
| 6.8 Konklusion . . . . .                                   | 69 |
| 6.9 Perspektiver . . . . .                                 | 69 |
| <br>   |    |
| 7. Vurdering af biologisk nedbrydning . . . . .            | 71 |
| (Jens Aamand og Kim Broholm)                               |    |
| 7.1 Anaerobe forhold . . . . .                             | 71 |
| 7.2 Aerobe forhold . . . . .                               | 72 |

Litteraturliste

Bilag: Udgivne rapporter om Skrydstrup Specialdepot.

## 1. INDLEDNING

Kim Broholm, Laboratoriet for teknisk Hygiejne (LTH), DTH  
Jens Aamand, Afdeling for Generel Mikrobiologi (AGM), Københavns Universitet

Denne rapport indeholder de væsentligste resultater opnået i de udviklingsprojekter vedrørende biologisk nedbrydning, der er udført i forbindelse med Skrydstrup specialdepot. Udviklingsprojekterne omhandler følgende emner:

- laboratorieforsøg til beskrivelse af den biologiske nedbrydning af klorerede alifater i jord og grundvand, samt forsøg til optimering af de biologiske processer.
- forsøg med et on-site pilotanlæg til biologisk nedbrydning af klorerede alifater i oppumpet grundvand.
- fuld-skala forsøg med biologisk nedbrydning af klorerede alifater i to midlertidige depoter indeholdende forurenede umættet jord.

I det følgende gives en kort beskrivelse af Skrydstrup specialdepot, samt de afværgeforanstaltninger der er anvendt for at oprense forureningen. For en mere detaljeret gennemgang af Skrydstrup specialdepot se Strøbæk (1989).

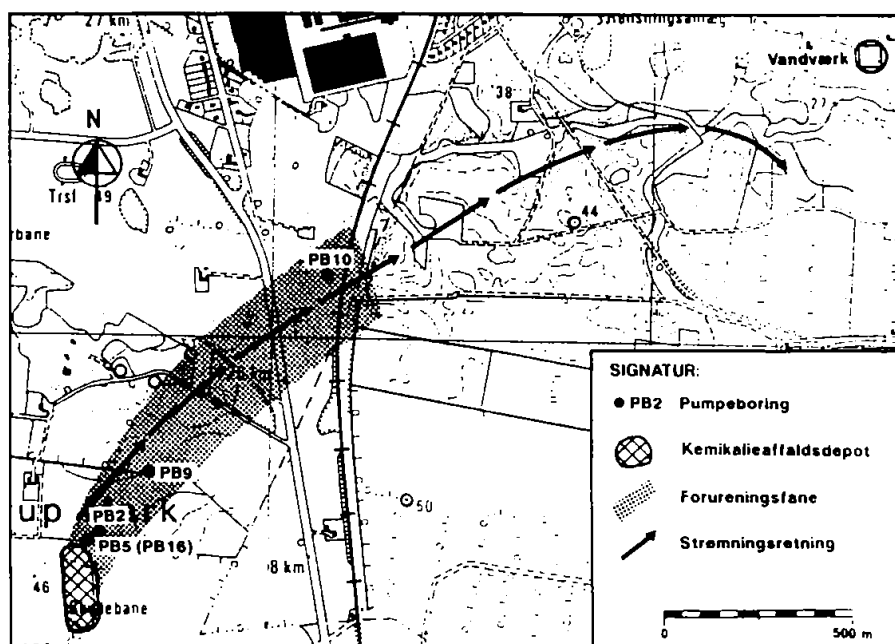
### 1.1 SKRYDSTRUP SPECIALDEPOT

Ved Skrydstrup specialdepot er i perioden 1963 - 1974 blevet deponeret kemikalieaffald fra køleskabsfabrikken A/S Brdr. Gram. Depotet, der omfatter et areal på 7000 m<sup>2</sup>, er beliggende i en tidligere grusgrav nær Skrydstrup lufthavn. Affaldet bestod fortrinsvis af tromler og malerbøtter, samt defekte fryser og køleskabe. For at formindske affaldsmængden blev plastaffaldet ofte afbrændt på pladsen. De skønnede affaldsmængder fremgår af tabel 1.1.

Denne omfattende deponering har medført en kraftig jord- og grundvandsforurening. Forureningen har bevæget sig i nordøstlig retning og truer således drikkevandet til et af Vojens bys to vandværker (figur 1.1). Forureningen består primært af klorerede alifater, samt to fosfor-organiske forbindelser (tri(3-chloropropyl)phosphat og tri(2-chlorethyl)-phosphat. I boringer nedstrøms depotet er fundet op til 13.000 µg/l 1,1,1-triklorethan, 280 µg/l triklorethen og 4 µg/l tetraklorethen. Desuden er fundet op til 400 µg/l af de organiske fosforforbindelser (Christiansen og Vedby, 1987). Der er udført en Botesam-boring ved depotet som viste, at grundvandsakviferen er aerob med iltkoncentrationer over 2 mg/l ned til 10,5 m under terræn (= 4 m under grundvandsspejl). Der er høje nitratkoncentrationer (fra 27 til 83 mg/l) ned til 17,5 m.u.t. og høje sulfatkoncentrationer (fra 23 mg/l til 100 mg/l) ned til 22 m u.t., svarende til bunden af Botesam boringen (DGU, 1988). Forureningsfanens rumlige placering har varieret, men den overvejende del af forureningen findes i den anoxiske zone, hvor der ikke er frit ilt men høje koncentrationer af nitrat.

TABEL 1.1 Estimerede affaldsmængder, som er blevet deponeret ved Skrydstrup specialdepot i årene 1963-1974 (Sønderjyllands Amt, 1987).

| Kemikalieaffaldstyper                                    | kg ialt |
|--|---------|
| Klorede alifater (triklorethen - 1,1,1-triklorethan)     | 30.000  |
| Malerslam, skumaffald (Xylener, butanoler, acetone, mv.) | 100.000 |
| Spildolie  | 20.000  |
| Syrerester (saltsyre, svovlsyre)                         | 30.000  |
| Plastaffald afbrændt                                     | ?       |
| Ialt   | 180.000 |



FIGUR 1.1: Kemikalieaffaldsdepotet i Skrydstrup med indskraveret forureningsfane og placering af de 4 anvendte pumpeboringer. I alt er der i dag 16 boringer (efter Jensen et al., 1990).

Afværgeforanstaltningerne blev påbegyndt i 1986, hvor det mest forurenede jord (ca. 200 tons) indeholdende bl.a. tromler med rene kemikalier blev gravet op og sendt til Kommuneke-mi, mens en større mængde (ca. 3500 m<sup>3</sup>) mindre forurenede jord blev deponeret i to midlertidige depoter (se kap. 5) ved siden af det gamle depot. Rensning af grundvandszonen og den umættede zone under det gamle depot blev påbegyndt i 1986. Det forurenede grundvand bliver pumpet op og renses ved luftstripping efterfulgt af en aktiv kul filtrering. Det rensede grundvand bliver herefter reinfiltret tilbage til grundvandet. Stripningen fjerner

stort set alle de klorerede alifater, mens aktiv kul filtreringen fjerner de organiske fosforforbindelser (Jensen et al., 1990).

## 1.2 KLOREDEDE ALIFATER

Der er en del forvirring i litteraturen vedrørende navngivning og forkortelser for de klorerede alifater. I denne rapport bruges betegnelsen klorerede alifater, som dækker over de klorerede stoffer afledt af metan ( $\text{CH}_4$ ), ethan ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ) og ethen ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ). Tabel 1.2 indeholder de systematiske navne, hyppigt anvendte trivialnavne, bruttoformeler og de mest anvendte forkortelser (som også anvendes i denne rapport) for de klorerede alifater.

De klorerede alifater er karakteriseret ved at være tungere end vand, meget flygtige og have en begrænset opløselighed i vand. Tabel 1.3 indeholder de relevante fysisk-kemiske data for de klorerede alifater.

TABEL 1.2 Oversigt over de klorerede opløsningsmidler, med angivelse af det systematiske navn, trivialnavn, kemiske bruttoformel og mest almindelige forkortelse.

| Systematisk navn      | Forkortelse | Bruttoformel                         | Trivialnavn(e)  |
|-----------------------|-------------|--------------------------------------|---|
| Klormethan            | -           | $\text{CH}_3\text{Cl}$               | methyl klorid   |
| Diklormethan          | -           | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$             | methylene klorid, methylene diklorid                        |
| Triklormethan         | -           | $\text{CHCl}_3$                      | kloroform   |
| Tetraklormethan       | -           | $\text{CCl}_4$                       | tetraklorkulstof, perklormetan                              |
| Klorethan             | -           | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Cl}$   | ethyl klorid, klorethyl                                     |
| 1,1-Diklorethan       | 1,1-DCA     | $\text{CH}_3\text{-CHCl}_2$          | ethyliden diklorid, asym-diklorethan                        |
| 1,2-Diklorethan       | 1,2-DCA     | $\text{CH}_2\text{Cl-CH}_2\text{Cl}$ | ethylen klorid, sym-diklorethan                             |
| 1,1,1-Triklorethan    | 1,1,1-TCA   | $\text{CH}_3\text{-CCl}_3$           | methylkloroform   |
| 1,1,2-Triklorethan    | 1,1,2-TCA   | $\text{CH}_2\text{Cl-CHCl}_2$        | vinyltriklorid  |
| Klorethen             | VC          | $\text{CH}_2=\text{CHCl}$            | vinylklorid, klorethylene                                   |
| 1,1-Diklorethen       | 1,1-DCE     | $\text{CH}_2=\text{CCl}_2$           | asym-diklorethylen, vinyliden diklorid, 1,1-diklorethylen   |
| cis-1,2-Diklorethen   | c-1,2-DCE   | $\text{CHCl}=\text{CHCl}$            | sym-diklorethylen, acetylen klorid, cis-1,2-diklorethylen   |
| trans-1,2-Diklorethen | t-1,2-DCE   | $\text{CHCl}=\text{CHCl}$            | sym-diklorethylen, acetylen klorid, trans-1,2-diklorethylen |
| Triklореthen          | TCE         | $\text{CHCl}=\text{CCl}_2$           | triklorethylen  |
| Tetraklorethen        | PCE         | $\text{CCl}_2=\text{CCl}_2$          | ethylentetraklorid, tetraklorethylen, perklorethylen        |

Klorerede alifater er blandt de hyppigst forekommende forureningskomponenter i jord og grundvand omkring kemikalieaffaldsdepoter og industrigrunde. I Københavns Amt er der påvist klorerede alifater i koncentrationer mellem 0,1 og 700  $\mu\text{g/l}$  i 22% af de undersøgte borer (Schultz og Rank, 1990).

Forbruget af klorerede alifater har været faldende fra ca. 13.000 tons i 1973 til ca. 4.500 tons i 1987 (Broholm, 1989). Dette fald skyldes især, at stoffene i mange tilfælde er erstattet af andre ikke klorerede opløsningsmidler. Klorerede alifater er primært blevet brugt til rensning og affedtning af metal og til kemisk rensning af tøj.

TABEL 1.3: De vigtigste fysisk-kemiske data for de klorerede opløsningsmidler. (Kjeldsen og Larsen, 1988; Gossett, 1987; Mackay og Shiu, 1981). MV: molvægten,  $\sigma$ : massefylden,  $K_p$ : kogepunkt, S: opløseligheden i vand, H: Henry's konstant,  $K_{ow}$ : oktanol/vand-forhold. Alle tal er ved 20-25°C. Tal i parentes er meget usikre.

| STOF                  | MV    | $\sigma$ | $K_p$ | S      | H                      | log $K_{ow}$ |
|-----------------------|-------|----------|-------|--------|------------------------|--------------|
|                       | -     | kg/l     | °C    | mg/l   | m <sup>3</sup> atm/mol | -            |
| Klormethan            | 50,5  | 0,92     | -23,7 | 6000   | 0,0094                 | 0,91         |
| Diklormethan          | 84,9  | 1,33     | 40    | 19400  | 0,0026                 | 1,25         |
| Triklormethan         | 119,4 | 1,48     | 61,7  | 8200   | 0,0038                 | 2,0          |
| Tetraklormethan       | 153,8 | 1,59     | 76,7  | 800    | 0,020                  | 2,62         |
| Klorethan             | 64,9  | 0,9      | 12,3  | 5740   | 0,012                  | -            |
| 1,1-Diklorethan       | 98,97 | 1,18     | 57,3  | 5500   | 0,0057                 | -            |
| 1,2-Diklorethan       | 98,97 | 1,24     | 83,5  | 8700   | 0,0011                 | 1,45         |
| 1,1,1-Triklorethan    | 133,4 | 1,34     | 74,1  | (800)  | 0,028                  | 2,2          |
| 1,1,2-Triklorethan    | 133,4 | 1,44     | 114   | 4420   | 0,0012                 | -            |
| Klorethen             | 62,5  | 0,92     | -14   | (60)   | 0,028                  | 0,6          |
| 1,1-Diklorethen       | 96,94 | 1,22     | 32    | (400)  | 0,026                  | 1,48         |
| cis-1,2-Diklorethen   | 96,94 | 1,29     | 60    | 3500   | 0,0041                 | -            |
| trans-1,2-Diklorethen | 96,94 | 1,26     | 48    | (6300) | 0,0094                 | 1,48         |
| Trikllorethen         | 131,4 | 1,46     | 87    | 1000   | 0,0096                 | 2,29         |
| Tetraklorethen        | 165,8 | 1,62     | 121   | (140)  | 0,018                  | 2,9          |

En række af de klorerede alifater (kloroform, tetraklormethan, 1,2-DCA og vinylklorid) er mistænkt for at være carcinogene. Drikkevandskvalitetskravet i Danmark for summen af klorerede alifater i drikkevand er 1  $\mu\text{g/l}$  (Miljøministeriet, 1988).

### 1.3 BIOLOGISK NEDBRYDNING AF KLOREREDE ALIFATER

Tilgængeligheden af ilt, nitrat, sulfat etc. i et givent miljø er afgørende for, hvilke grupper af bakterier der er aktive. Ved høje redoxpotentialer, hvor ilt er tilstede, vil miljøet være domineret af aerobe organismer. Som følge af den biologiske omsætning af organisk materiale vil ilten efterhånden opbruges, redoxpotentialet falde og denitrificerende bakterier, der kan anvende nitrat i stedet for ilt, bliver favoriseret.

I miljøer, hvor der hverken er ilt eller nitrat tilstede, vil sulfatreducerende- og forgærende bakterier overtage den mikrobielle omsætning, mens det ved de helt lave redoxpotentialer kun er methanogene og forgærende bakterier, der er aktive. Sidstnævnte anvender enten kuldioxid eller organiske forbindelser som energikilde.

Kun bestemte grupper af organismer kan omdanne de forskellige klorerede alifater, og tilgængeligheden af ovennævnte stoffer vil derfor være bestemmende for, hvorvidt en sådan omdannelse vil forløbe.

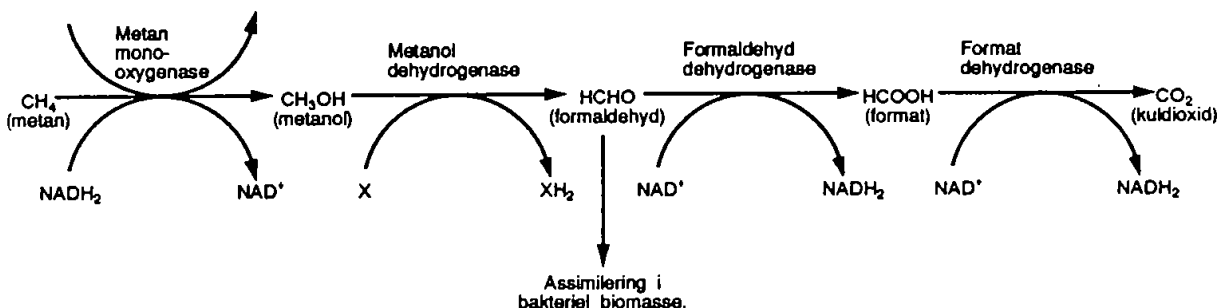
### 1.3.1 Aerob nedbrydning

Klorerede alifater (med enkelte undtagelser som diklormethan (Brunner et al., 1980)) betragtes som ikke nedbrydelige under aerobe forhold, hvis stoffet er tilstede alene. Til gengæld kan en række klorerede alifater nedbrydes ved en co-metabolisk proces, hvor bakterierne samtidig med at omsætte et primært substrat (som bruges til energi- og kulstofkilde) nedbryder f.eks. TCE, som bakterierne ikke kan anvende som energi- eller kulstofkilde.

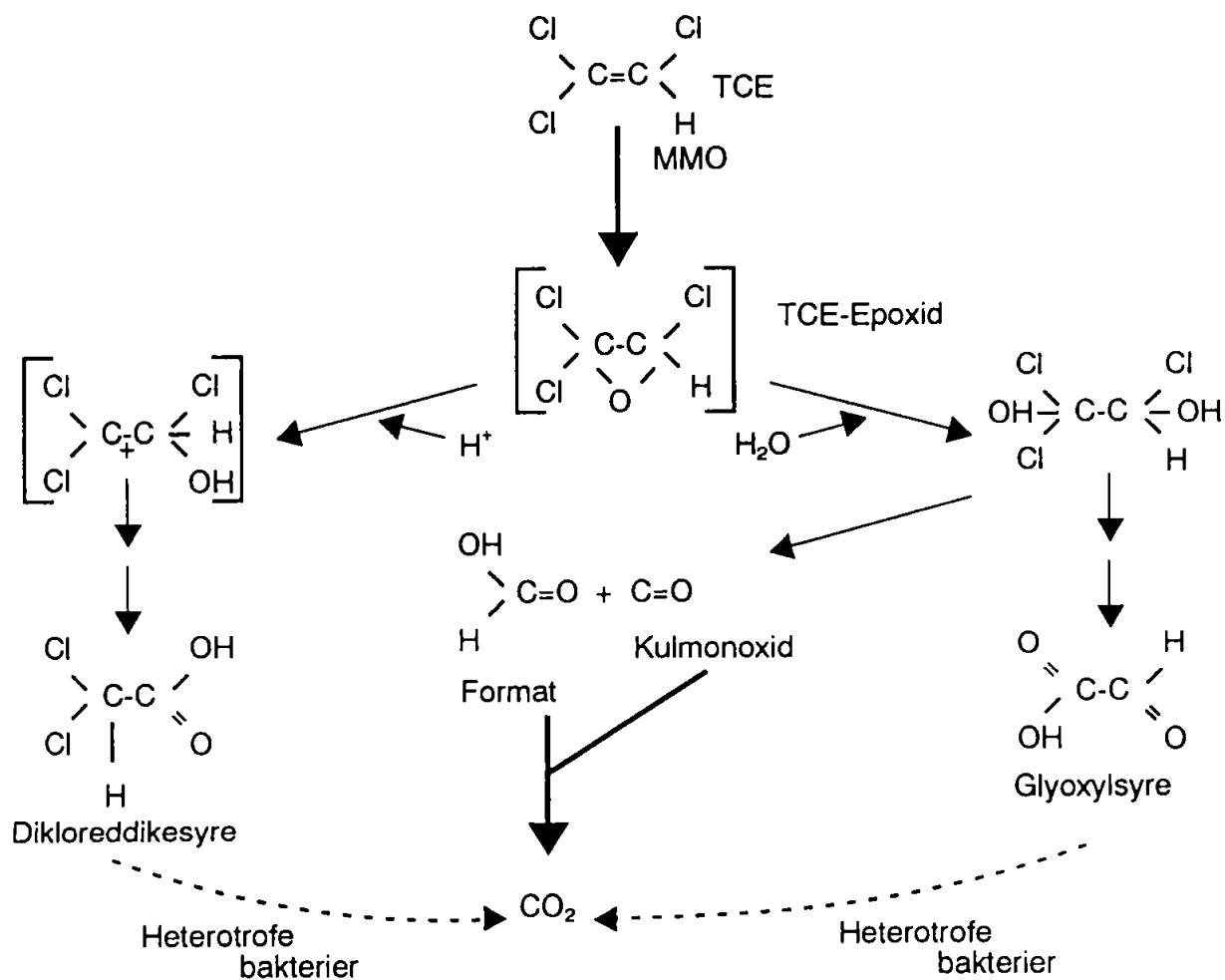
Mange laboratorieforsøg har vist, at methan-oxiderende bakterier fra jord og grundvand har evnen til at nedbryde klorerede alifater samtidig med omsætningen af methan (Fogel et al., 1986; Henson et al., 1988; Henson et al., 1989; Oldenhuis et al., 1989; Strand og Shippert, 1986; Wilson og Wilson, 1985). Laboratorieforsøg med forskellige blandings- og renkulturer har vist, at nedbrydningshastigheden generelt stiger med faldende kloreringsgrad, og at PCE og tetraklormethan ikke er nedbrydeligt under aerobe forhold (Henson et al., 1989; Oldenhuis et al., 1989).

De methan-oxiderende bakterier har været undersøgt igennem de sidste 20 år, og nedbrydningsveje og enzymsystemer er derfor rimeligt kendt. Nedbrydningsvejen for methan er vist i figur 1.2 (Dalton og Stirling, 1982). Det første trin i nedbrydningen af methan til kuldioxid er omsætningen af methan til methanol, der foretages af enzymet methan-monooxygenase (MMO), som også er ansvarlig for det første trin i nedbrydningen af de klorerede alifater. Nogle methan-oxiderende bakterier kan kun udnytte methan som kulstof og energikilde (methanotropher) mens andre kan udnytte både methan og simple methylerede forbindelser (methylotropher). Der er imidlertid ingen entydig definition på adskillelsen imellem methanotropher og methylotropher. I denne rapport bruges betegnelsen methan-oxiderende bakterier og methanotropher om bakterier, der kan anvende methan som eneste energi- og kulstofkilde.

De fleste methan-oxiderende bakterier kan udtrykke to slags MMO: et partikulært eller membranbundet (p-MMO) og et opløseligt (s-MMO). Hvilken form bakterierne udtrykker afhænger af tilgængeligheden af kobber. Udsættes bakterierne for kobbermangel udtrykkes s-MMO, mens p-MMO udtrykkes ved høje kobberkoncentrationer. Undersøgelser har vist, at der er stor forskel på de to enzyms evne til at nedbryde andre stoffer end methan.



FIGUR 1.2: Nedbrydningsvejen for metan (Dalton og Stirling, 1982).



FIGUR 1.3 En nedbrydningsvej for TCE for aerob nedbrydning foretaget af en renkultur af metanoxiderende bakterier (Little et al., 1988).

Nedbrydningsvejen for de klorerede alifater er kun undersøgt i enkelte tilfælde. Little et al. (1988) har i forsøg med en renkultur af methan-oxiderende bakterier foreslået en nedbrydningsvej for TCE (se figur 1.3). TCE omsættes biologisk af methan-oxiderende bakterier til TCE-epoxide, som kemisk omdannes til forskellige forbindelser med et eller to kulstofatomer.

Disse forbindelser omsættes yderligere biologisk til kuldioxid af enten heterotrofe eller methan-oxiderende bakterier. Nedbrydningen af 1,1,1-TCA er fundet at forløbe via 2,2,2-trikloretanol ( $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CCl}_3$ ) (Oldenhuis et al., 1989), som sandsynligvis nedbrydes videre af heterotrofe bakterier til kuldioxid. Den aerobe nedbrydning af klorerede alifater forløber derfor sandsynligvis uden ophobning af toksiske mellemprodukter, i modsætning til hvad der er tilfældet under anaerobe forhold.

TCE kan også nedbrydes cometabolisk af andre grupper af bakterier. I tabel 1.4 er refereret de forsøg, hvor det er lykkedes at opnå nedbrydning af klorerede alifater med andre bakterier end methanoxiderende bakterier. Desuden har forsøg vist at diklormethan kan nedbrydes uden tilsætning af primærsubstrat (Brunner et al., 1980).

TABEL 1.4. Forsøg med aerob nedbrydning af klorerede alifater med andre bakterier end methan-oxiderende bakterier.

| Primær substrat                               | Sekundær substrat  | Bakterie                                      | Referencer                |
|---|--------------------|---|---------------------------|
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CO <sub>2</sub> | flere <sup>b</sup> | <i>Nitrosomonas europaea</i>                  | Vannelli et al., (1990)   |
| phenol/toluen                                 | TCE                | blandingskultur                               | Nelson et al., (1988)     |
| phenol/2,4-D <sup>a</sup>                     | TCE                | <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134           | Harker og Kim, (1990)     |
| propan  | flere <sup>c</sup> | <i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5 <sup>d</sup> | Wackett et al., (1989)    |
| propan  | 1,1,1-TCA<br>TCE   | blandingskultur                               | Canter et al., (1989)     |
| toluen  | TCE                | <i>Pseudomonas putida</i> F1                  | Wackett og Gibson, (1988) |
| kvælstof/CO <sub>2</sub>                      | 1,2-DCA            | <i>Xanthobacter autotrophicus</i> GJ10        | Janssen et al., (1985)    |

a: 2,4 Diklorphenoxyeddikesyre

b: Nedbrydning af diklormethan, triklormethan, 1,1,1-TCA, 1,1,2-TCA, vinylklorid, 1,1-DCE, cis 1,2-DCE, trans 1,2-DCE og TCE

c: Nedbrydning af vinylklorid, 1,1-DCE, cis-1,2-DCE og TCE

d: Der blev påvist TCE nedbrydning med andre renkulturer af propanoxiderende bakterier, men *Mycobacterium vaccae* JOB5 var den mest effektive blandt de undersøgte kulturer.

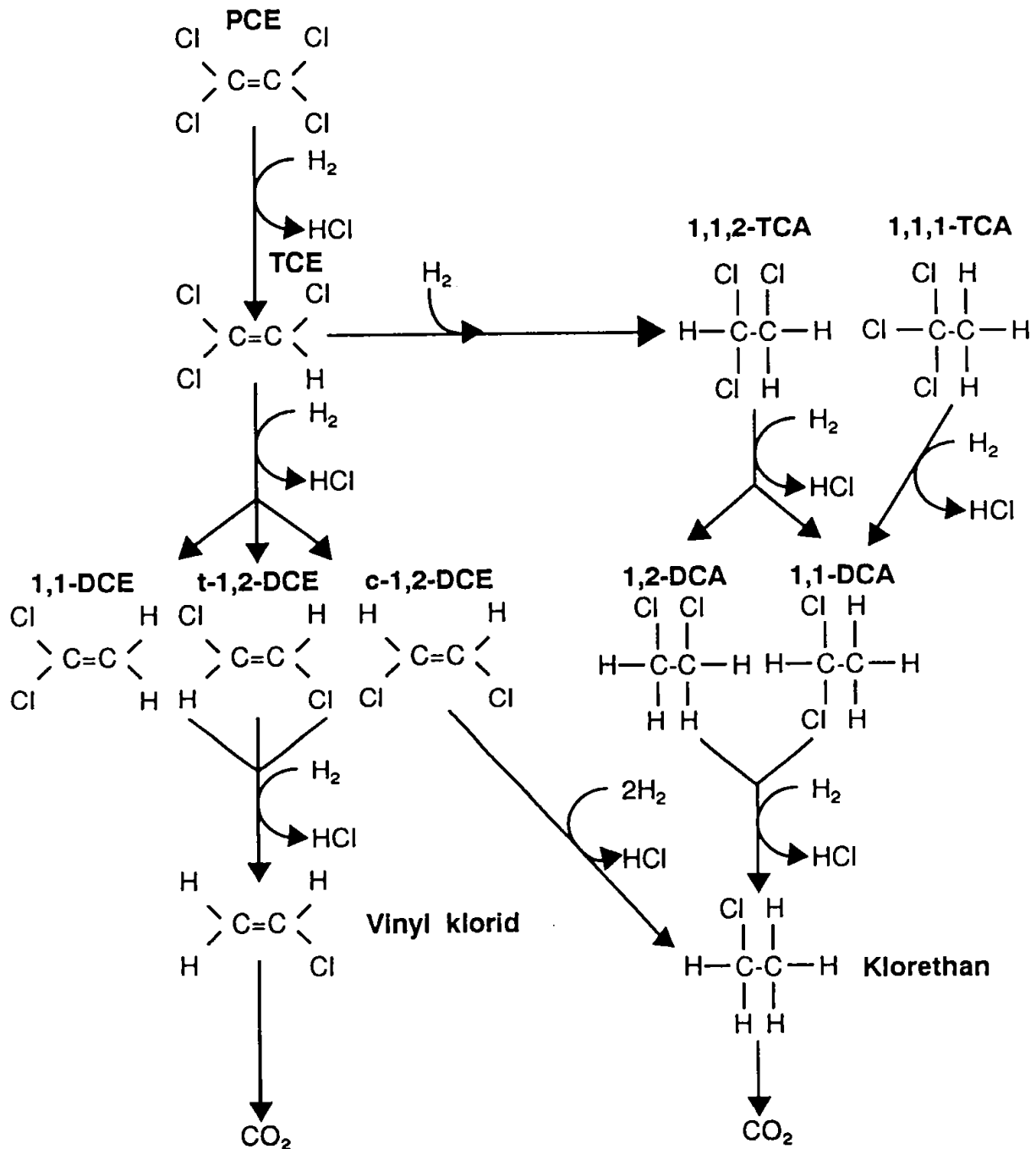
### 1.3.2 Anaerob nedbrydning

Anaerob omdannelse af klorerede alifater er hovedsageligt demonstreret ved meget lave redoxpotentialer, hvor hverken ilt, nitrat eller sulfat er tilstede.

Omdannelsen forløber ved reduktiv deklorering, en proces hvor et kloratom substitueres med brint (figur 1.4). I modsætning til aerobe nedbrydningsprocesser er det under anaerobe forhold de klorerede alifater med flest klorsubstituent, der lettest nedbrydes. Nedbrydningen kommer derfor til at forløbe sekventielt, og der vil midlertidigt ophobes alifater med færre kloratomer (figur 1.4). Først når størsteparten af f.eks. PCE er reduktivt dekloreret til TCE, begynder den reduktive deklorering af TCE til diklorethener o.s.v. (Vogel og McCarty, 1985). Vinylklorid med kun et kloratom nedbrydes vanskeligt under anaerobe forhold. Dette er et problem, da netop vinylklorid regnes som værende den mest toksiske af de klorerede alifatiske forbindelser. Der er kun få undersøgelser, der beskriver reduktiv deklorering af vinylklorid med produktion af ethen (CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>) til følge (Freedman og Gossett, 1989).

Klorerede ethaner som f.eks. 1,1,1-TCA nedbrydes under anaerobe forhold analogt til de klorerede ethener. Igen dekloreres de højest klorerede forbindelser lettest efterfulgt af ophobning af diklorethener og klorethan til følge (Vogel og McCarty, 1987). 1,1,1-TCA kan desuden omdannes abiotisk til 1,1-DCE, men med halveringstider, der er væsentligt lavere, end hvad der almindeligvis observeres i biologiske systemer (Gälli og McCarty, 1989), (figur 1.4). Som følge af de biotiske og abiotiske processer vil et miljø oprindeligt forurenet med f.eks. triklourethan ændre sig, således at der med tiden vil findes en række forskellige





Figur 1.4: Anaerobe nedbrydningsveje for tetraklorethylen og triklorethan. Forkortelser: PCE, tetraklorethylen; TCE, Triklorethylen; DCE, diklorethylen; TCA, triklorethan; DCA, diklorethan.

klorerede forbindelser; stoffer der vil være mere eller mindre toksiske og mere eller mindre nedbrydelige.

Det er i dag uklart hvilke mikroorganismer, der er ansvarlige for den reductive deklorering. Det er i forsøg med renkulturer af methanbakterier vist, at disse bakterier kan dehalogenere

forskellige klorerede og bromerede ethaner og ethener, når et eller flere af deres naturlige vækstsubstrater er tilstede, d.v.s. acetat, brint, methanol eller format (Belay og Daniels, 1987; Fathepure og Boyd, 1988 og Fathepure et al., 1987). Ligeledes er der blevet observeret en mindre deklorering af 1,1,1-TCA i renkulturer af forgærende bakterier (Gälli og McCarty, 1989). Nedbrydningen forløber dog væsentligt langsommere end observeret i forsøg med blandede anaerobe bakteriekulturer.

Mikroorganismene udnytter ikke kulstoffet i de klorerede forbindelser til opbygning af biomasse og er derfor afhængige af at få tilført en primær kulstofkilde. En række substrater som lactat, glucose, methanol, brint, format og acetat har vist sig at kunne understøtte reduktiv deklorering i blandede kulturer (Freedman og Gossett, 1989). Det er dog uafklaret, om de deklorerende bakterier i disse systemer direkte udnytter den primære kulstofkilde, eller om de udnytter forskellige ukendte produkter produceret af andre mikroorganismer ved den anaerobe forgæring. Hydrogen har vist sig at have en stimulerende virkning på den mikrobielle omdannelse af PCE og TCE (Aamand et al., 1990). Forklaringen på en sådan stimulering kan være, at den deklorerende bakterie er i stand til at udnytte hydrogen som energikilde, (der findes både methanogene, sulfatreducerende og forgærende bakterier, der er i stand til at udnytte hydrogen samtidig med, at de indbygger kulstof fra  $\text{CO}_2$  i biomassen). En anden forklaring kan være, at den stimulerende effekt er en følge af, at hydrogen indgår som reaktant i den reduktive deklorering.

## 2. AEROB NEDBRYDNING I FORURENET, UMÆTTET JORD

Kim Broholm, Laboratoriet for teknisk Hygiejne (LtH) DTH.

Det mest forurenede jord ved Skrydstrup Specialdepot blev gravet væk og enten sendt til forbrænding på Kommune Kemi eller deponeret i to midlertidige depoter (kapitel 5). En stor del af den mættede og umættede zone under det gamle depot var imidlertid stadigvæk forurenede. Som et fremtidigt alternativ til de traditionelle behandlingsmetoder (stripning og aktiv kul filtrering) blev der gennemført en række laboratorieforsøg med det formål, at undersøge mulighederne for at foretage en in-situ aerob biologisk nedbrydning af klorerede alifater i umættet jord.

Der blev udført to typer forsøg: Simple batchforsøg, til påvirkning af, om en aerob biologisk nedbrydning af klorerede alifater var mulig i jorden ved Skrydstrup specialdepot, og søjleforsøg, hvor processen afprøvedes under mere naturlige forhold.

### 2.1 FORSØGSOPSTILLING

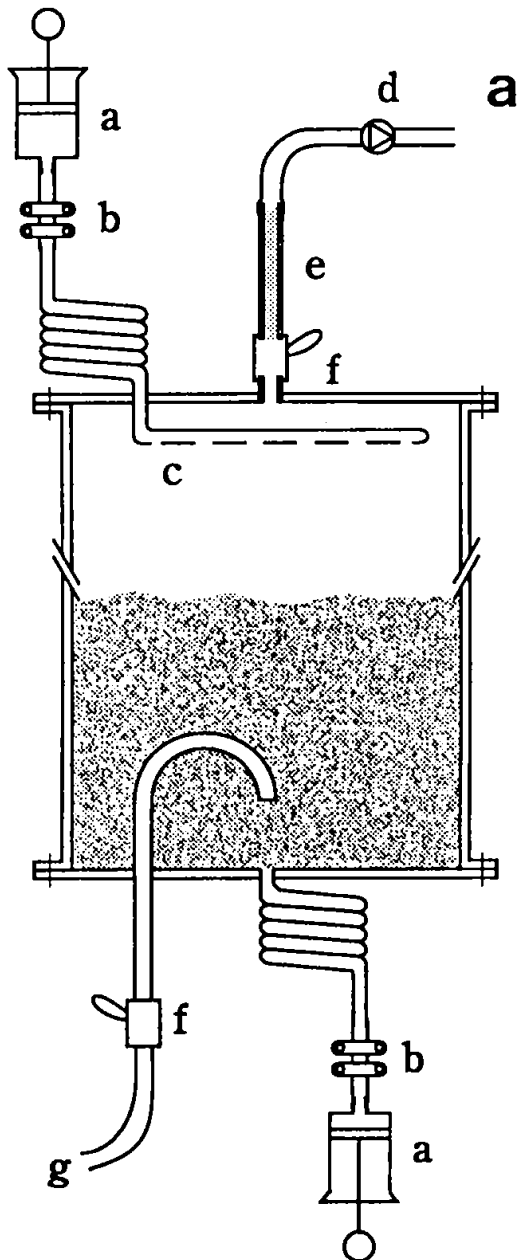
#### 2.1.1 Batchforsøg

Batchforsøgene blev udført i 117 ml glasflasker forsynet med gastætte teflonbelagte Miniert propper. Hver flaske blev tilsat 20 g umættet jord fra Skrydstrup specialdepot. Jorden blev inden forsøget pre-eksponeret til methan i 40 dage. I slutningen af denne periode observeredes et signifikant methanforbrug. 1,1,1-TCA og TCE tilsattes til en begyndelseskoncentration på 200-300  $\mu\text{g/l}$  i luftfasen og methan tilsattes til en begyndelseskoncentration på 2% (vol./vol.) i luftfasen. Kontrolflasker indeholdt enten autoklaveret jord for at hindre mikrobiel aktivitet eller var uden methan for at undgå vækst af methan-oxiderende bakterier. Flaskerne blev inkuberet i mørke ved 20°C. Koncentrationen af henholdsvis 1,1,1-TCA, TCE og methan blev fulgt ved at udtage luftprøver fra flaskerne med en gastæt sprøjte. Luftprøver blev injiceret direkte på gaschromatograf.

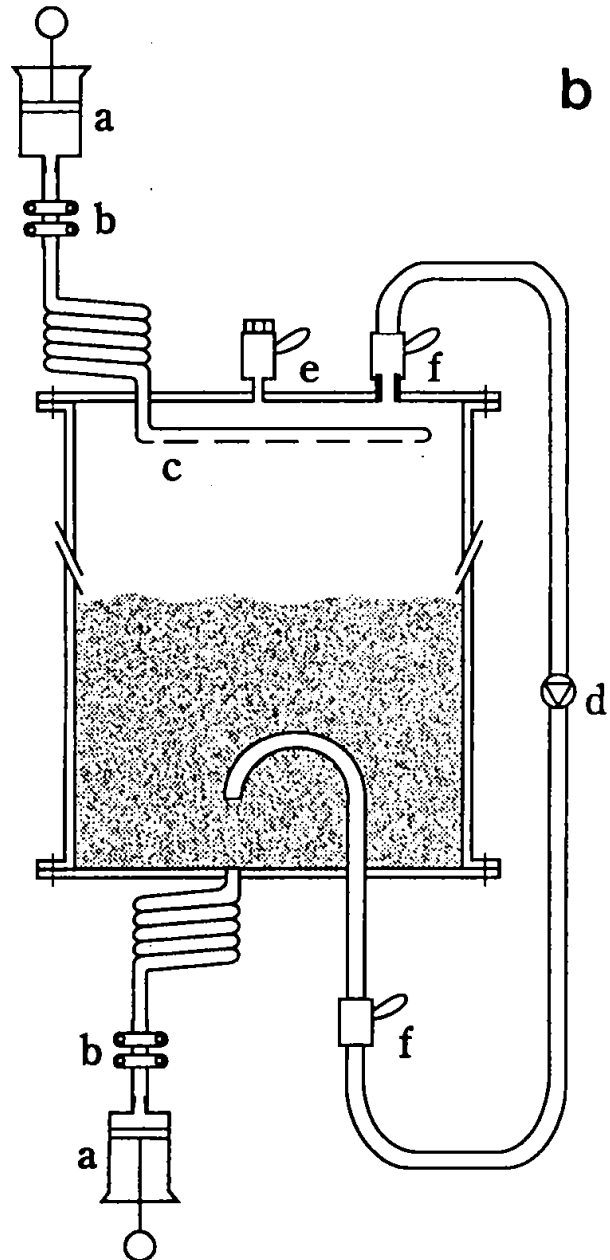
#### 2.1.2 Søjleforsøg

Der blev gennemført søjleforsøg med to typer forsøgsopstilling: en uden og en med recirkulering af luften.

I figur 2.1 er vist en skitse af søjleforsøgsopstillingen med og uden recirkulering af luften. Søjlerne, der er udført af rustfrit stål, er 75 cm høje og 10 cm i diameter. Hver søjle indeholdt ca. 9 kg umættet jord. Søjlerne blev infiltreret med 20 eller 40 ml nærings-saltopløsning pr. dag svarende til 75 eller 150 mm nedbør pr. måned under naturlige forhold.



Figur 2.1a: Design af søjlerne uden recirkulering. a/ sprøjte til tilsætning og prøvetagning af vand, b/ slangeklemmer, c/ vandfordeler, d/ pumpe til kontrol af tilførslen af metan og luft, e/ XAD-2 filter til opfangning af klorerede alifater i udløbsluften, f/ on/off ventil, g/ metan og luft tilførsel.



Figur 2.1b: Design af søjlerne med recirkulering. a/ sprøjte til tilsætning og prøvetagning af vand, b/ slangeklemmer, c/ vandfordeler, d/ pumpe til kontrol af recirkuleringen af metan og luft, e/ on/off ventil hvorigennem metan og ilt kan tilsættes med en sprøjte, f/ on/off ventil.

I bunden af hver søjle tilsættes en gasblanding af 2% (vol/vol) metan i atmosfærisk luft. Til controlsøjlerne blev kun tilsat atmosfærisk luft. Søjlerne blev tilsat en ny mængde luft/methan, når enten metanen eller ilten var opbrugt. Udløbsluften fra søjlerne ledtes igennem et XAD-2 filter for at opfange den mængde klorerede alifater, som fjernes ved

stripping. Søjlerne blev inkuberet ved 10°C. Under forsøget blev koncentrationen af 1,1,1-TCA, TCE og PCE målt i både udløbsvandet og i udløbsluften. For at styre methan/luft tilsætningen blev der målt methan på luftprøver udtaget i toppen af søjlen og ilt på vandprøver udtaget i bunden af søjlen.

For at undgå stripping opstilledes søjler, hvor luften blev recirkuleret. I disse søjler blev udløbsluften forbundet med indløbsluften med et stålrør. Et lille stykke stålrør blev erstattet med vitonslange for at kunne påsætte en peristaltisk pumpe til styring af recirkulations-hastigheden. Søjlerne indeholdt ca. 7,7 kg umættet jord og infiltreredes med 5 ml næringssaltopløsning pr. dag svarende til 18 mm nedbør pr. måned. Til toppen af søjlen blev ren ilt og ren methan tilsat i mængder, der resulterede i koncentrationer på 21% (vol/vol) ilt og 2% (vol/vol) methan. Efter hver ny methan/ilt tilsætning recirkuleredes luftblandingen igennem søjlen for at opnå en effektiv fordeling af methan/ilt i jorden.

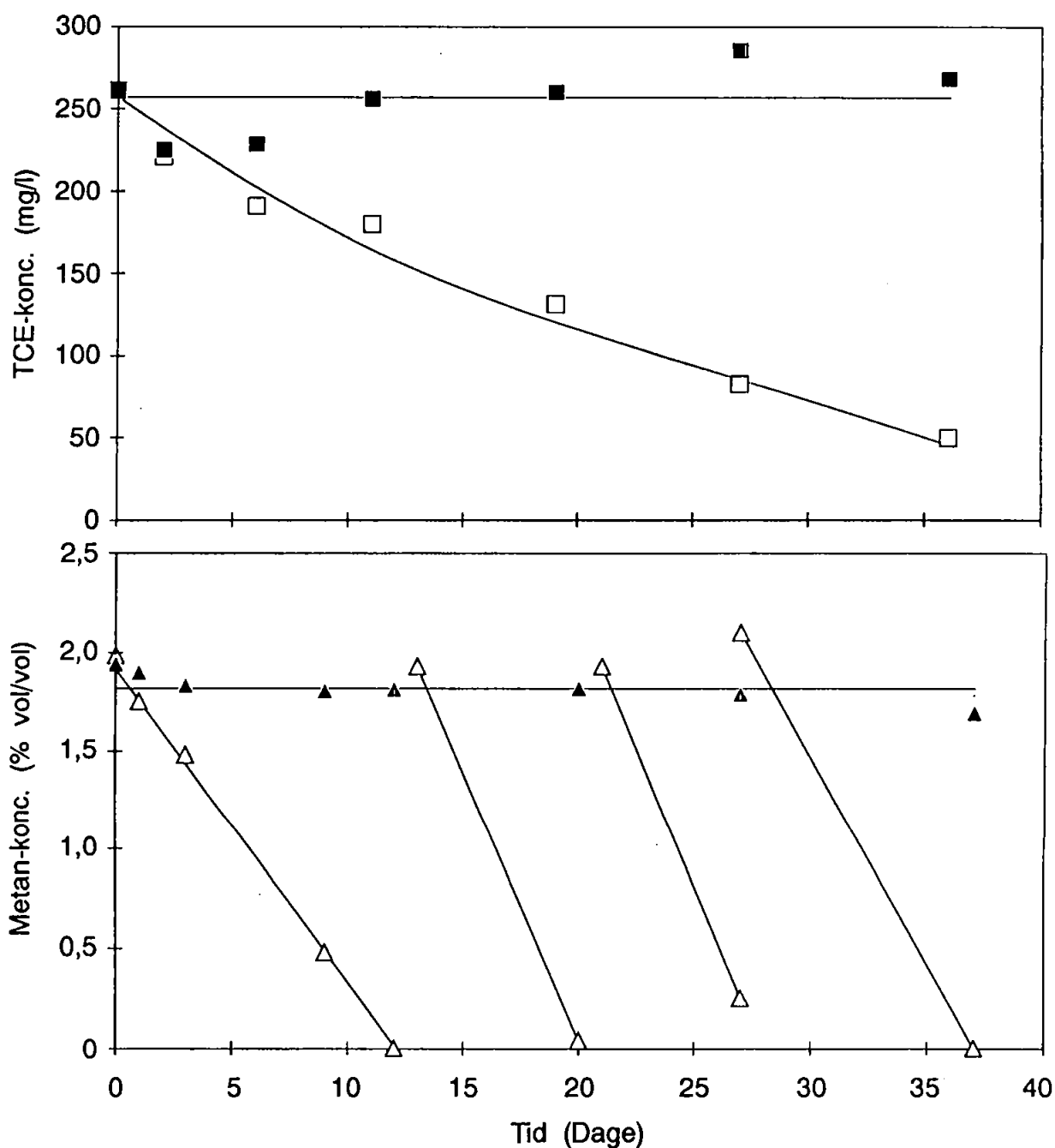
Tabel 2.1: Jordkoncentrationen (mg/kg våd jord) og udløbskoncentrationen (mg/l) af henholdsvis 1,1,1-TCA, TCE og PCE ved starten af søjleforsøget, samt kornstørrelsesfordelingen for de to jordtyper.

| Jordtype                                  | 1                  | 2                 |
|---|--------------------|-------------------|
|   | uden recirkulering | med recirkulering |
| <b>Jordkoncentration (mg/kg våd jord)</b> |                    |                   |
| 1,1,1-Triklorethan                        | 190                | 0,23              |
| Triklorethylen                            | 25                 | 0,15              |
| Tetraklorethylen                          | 19                 | 0,048             |
| <b>Udløbskoncentration (mg/l)</b>         |                    |                   |
| 1,1,1-Triklorethan                        | 20                 | 2                 |
| Triklorethylen                            | 3                  | 0,8               |
| Tetraklorethylen                          | 0,4                | 0,1               |
| <b>Kornstørrelsesfordeling</b>            |                    |                   |
| grus (> 2 mm)                             | 5%                 | 0%                |
| groft sand (0,2-2 mm)                     | 80%                | 63%               |
| fint sand (0,02-0,2 mm)                   | 13%                | 35%               |
| silt og ler (< 0,02 mm)                   | < 2%               | < 2%              |

### 2.1.3 Jord

Jorden, der blev benyttet i søjleforsøgene, var udtaget fra den umættede zone ved Skrydstrup Specialdepot. Jordtype 1 indeholdt den oprindelige forurening, hvorimod jordtype 2 blev forurennet i laboratoriet, efter at søjlerne var pakket med jord. Startkoncentrationen af klorerede alifater i de to jordtyper blev estimeret ud fra dels jordprøver udtaget under pakning af søjlerne (for jordtype 1) og dels ved jordprøver udtaget fra en ekstra søjle pakket og

forurenet som de øvrige (for jordtype 2). I tabel 2.1 er vist de målte jordkoncentrationer af 1,1,1-TCA, TCE og PCE ved forsøgets start, samt udløbskoncentrationen af 1,1,1-TCA, TCE og PCE i vandet ved forsøgets start. Desuden er kornstørrelsesfordelingen for de to jordtyper vist.



Figur 2.2: Luftkoncentrationen af methan (△) og TCE (□) i et batchforsøg med jord, som var eksponeret til methan før forsøget, og methan (▲) og TCE (■) i et batchforsøg med autoklaveret jord. Ved dag 0, 12, 20 og 27 blev der tilsat methan til batchene med methanomsætning.

## 2.2 RESULTATER OG DISKUSSION

### 2.2.1 Batchforsøg

Figur 2.2 viser koncentrationen af TCE og methan i nedbrydningsforsøg og kontrolforsøg med autoklaveret jord. Umiddelbart efter tilsætningen af 1,1,1-TCA og TCE fortsætter omsætningen af methan, samtidig med at TCE nedbrydes. Der observeredes ingen nedbrydning af 1,1,1-TCA, hvilket er i overensstemmelse med, at nedbrydningshastigheden for 1,1,1-TCA er meget lavere end for TCE (Strand et al., 1990).

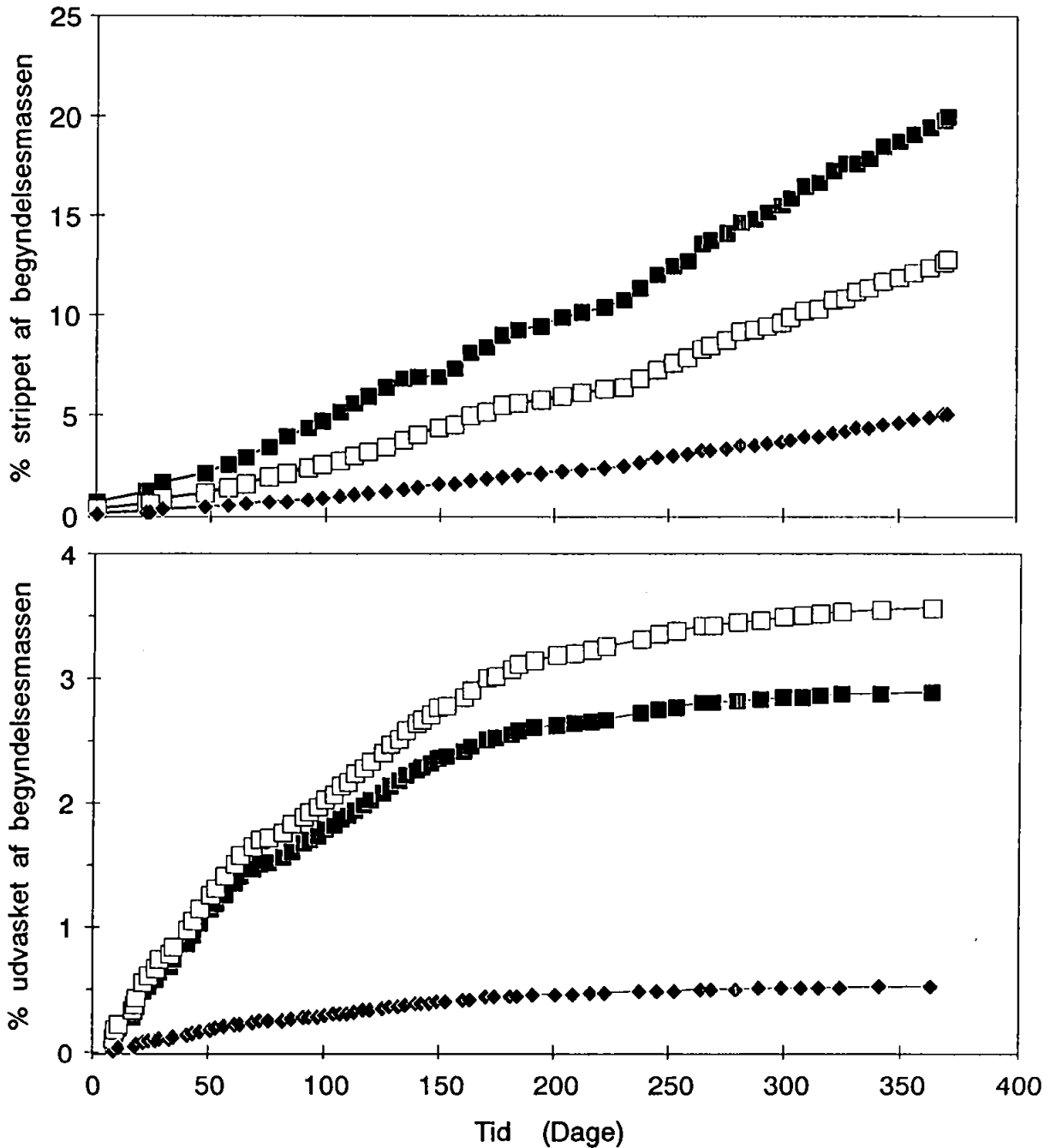
Forsøgene viser, at der i den umættede jord ud fra den oprindelige bakteriepopulation kan opformeres en methan-oxiderende biomasse med potentiale for nedbrydning af klorerede alifater (her TCE).

### 2.2.2 Søjleforsøg

I søjlerne med jordtype 1 varede det omkring 240 dage, før der blev observeret et methanforbrug. Dette er meget længere end i jorden, der blev anvendt i batchforsøgene, hvor opformeringen varede mindre end 40 dage. I et tilsvarende søjleforsøg uden recirkulering med en mindre forurenede jord (begyndelseskoncentrationer: 1,1,1-TCA: 1,1 mg/kg; TCE: 0,5 mg/kg; PCE: 1,1 mg/kg) var opformeringsfasen kun 40 dage. Denne forskel tyder på, at jordtype 1 indeholdt toksiske koncentrationer af de klorerede alifater. Omsætningshastigheden af methan var 0,5 og 1,8 mg methan/kg jord/dag for henholdsvis den stærkt og let forurenede jord, hvilket bekræfter, at omsætningen af methan er inhiberet. For at undersøge om denne toksiske effekt skyldes tilstedeværelsen af 1,1,1-TCA og TCE, blev der gennemført en række batchforsøg med en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier (se afsnit 3.2). Batchforsøgene viste, at en TCE koncentration på 13 mg/l kan medføre en total inhibering af de methan-oxiderende bakterier, hvorimod en 1,1,1-TCA koncentration på 103 mg/l kun medførte en delvis inhibering. For både TCE og 1,1,1-TCA blev der observeret en stigende inhibering af methanomsætningen med stigende koncentrationer af TCE og 1,1,1-TCA. Væskekonsentrationen af 1,1,1-TCA (> 103 mg/l) og TCE (13 mg/l), der medfører en inhiberende effekt, kan omregnes til følgende jordkoncentrationer: > 10 mg 1,1,1-TCA/kg jord TS og 1,6 mg TCE/kg jord TS (Tabel 3.4). Sammenlignes disse værdier med koncentrationen af 1,1,1-TCA og TCE i jordtype 1 ses, at det er sandsynligt, at stofferne er tilstede i toksiske koncentrationer.

Jordtype 2 blev podet med bakterier, så der blev ikke observeret nogen opformeringsfase for denne jordtype. Nogle søjler med jordtype 1 blev ligeledes forsøgt podet, men tilsætningen af methan-oxiderende bakterier medførte ingen umiddelbar methanomsætning, sandsynligvis på grund af de toksiske koncentrationer af de tilstedeværende stoffer.

For yderligere at undersøge opformeringen af methan-oxiderende bakterier, blev der målt ATP (adenosine triphosphate) og MPN (Most Probable Number) i jorden før forsøgets start og ved forsøgets afslutning. ATP er et mål for den totale biomasse i jorden, og MPN er et specifikt mål for det totale antal methan-oxiderende bakterier. Startkoncentrationen af ATP var mellem 25 og 125 ng/g jord (=  $2,9-7,4 \cdot 10^9$  bakterier pr. g jord) og antallet af methan-oxiderende bakterier (MPN) var mindre end 2 pr. g jord. Efter forsøgets afslutning var antallet af methan-oxiderende bakterier steget til mellem <2 pr. g jord i toppen af søjlen,



Figur 2.3: Den akkumulerede relative mængde af 1,1,1-TCA (■), TCE (□) og PCE (◆), som blev udvasket og strippet fra en søjle uden recirkulering med jordtype 1 og som blev tilsat methan.

hvor vandindholdet var meget lavt, til 3300 pr. g jord i bunden af søjlen, hvorimod ATP indholdet var uændret. De methan-oxiderende bakterier udgjorde således en meget lille del af den samlede biomasse. I en kontrolsøjle observeredes ingen ændring af koncentrationen af ATP under forsøget, og antallet af methan-oxiderende var ved forsøgets afslutning  $< 2$



pr. g jord. Det bekræfter, at tilførslen af methan bevirkede en opvækst af methan-oxiderende bakterier.

I figur 2.3 er for en søjle med jordtype 1 vist den akkumulerede udvaskning af 1,1,1-TCA, TCE og PCE, som følge af næringssalttilsætningen, og den akkumulerede stripning, som følge af gastilsætningen. Kurven for den akkumulerede udvaskning afbøjer efter 150 dage, hvilket skyldes, at tilsætningen af næringssalte nedsættes. Figur 2.3 viser, at 1,1,1-TCA og TCE lettest fjernes ved udvaskning og stripning, hvorimod der under forsøget ikke er fjernet store mængder PCE ved stripning og udvaskning, hvilket skyldes, at i forhold til 1,1,1-TCA og TCE sidder relativt meget af PCE'en på jorden, idet sorptionen af PCE er større end for 1,1,1-TCA og TCE.

For at undersøge om der skete en nedbrydning af de klorerede alifater som følge af methan tilsætningen, blev der opstillet massebalancer for 1,1,1-TCA, TCE og PCE på hver enkelt søjle. Parametrene i massebalancen er startmængden af stof i søjlen, den genfundne mængde stof i søjlen, da forsøget sluttede, samt den totale mængde af stof, der er fjernet ved stripning og ved udvaskning. Differencen angiver den mængde stof, som ikke er enten genfundet ved forsøgets afslutning eller fjernet ved stripning og udvaskning. I kontrolsøjlerne uden methantilsætning er udvaskning og stripning de eneste fjernelsesmekanismer, hvorimod i søjlerne med methantilsætning kan noget stof være fjernet ved biologisk nedbrydning. Massebalancerne er vist i tabel 2.2 efter 373 dage (uden recirkulering) og 289 dage (med recirkulering). Differencen i kontrolsøjlerne varierede mellem 4,5% og 26,8%. Dette tab skyldes sandsynligvis mindre utætheder i søjlerne under den lange forsøgsperiode.

I søjlerne uden recirkulering var differencen for 1,1,1-TCA 54,6%, for TCE 32,5% og for PCE 16,2%. Hvis disse tal sammenlignes med differencen i kontrolsøjlerne, der var på mellem 4,5% og 26,8%, tyder det på, at der er sket en svag nedbrydning i størrelsesordenen 20% af 1,1,1-TCA og TCE, men ikke af PCE. Stripningen af 1,1,1-TCA og TCE i det samme forsøg var henholdsvis 16,2% og 12,0%, altså i samme størrelsesorden som nedbrydningen. Søjleforsøget uden recirkulering blev stoppet efter 373 dage. Jorden indeholdt på det tidspunkt stadig store mængder af klorerede alifater og var kun delvist rensat.

I søjlerne med recirkulering var differencen for 1,1,1-TCA 78,7%, for TCE 81,4% og for PCE 22,1%. Sammenlignes disse tal med differencen i kontrolsøjlerne ses, at der er sket en nedbrydning af 1,1,1-TCA og TCE på omkring 60%, men ikke af PCE. Dette forsøg blev stoppet efter 289 dage. På det tidspunkt var udløbskoncentration i vandet fra søjlen 50 µg/l for 1,1,1-TCA, 34 µg/l for TCE og 50 µg/l for PCE, hvilket viser, at heller ikke denne jord var rensat totalt for 1,1,1-TCA og TCE, selvom under 10% af den oprindelig mængde af 1,1,1-TCA og TCE var tilbage i jorden.

Et vejledende kvalitetskrav for TCE i jord, som skal anvendes til følsomme formål (ved institutioner og beboelse), er 1 mg/kg (Miljøstyrelsen, 1990). Denne grænseværdi er baseret på afgivelsen af TCE fra jorden til luften. Koncentrationen af TCE i jordtype 2 ved forsøgets start var 0,15 mg/kg og efter forsøgets afslutning omkring 0,014 mg/kg, dvs denne jord indeholdt en acceptabel koncentration af TCE.

Tabel 2.2: Massebalancer for 1,1,1-TCA, TCE og PCE for søjleforsøgene efter 373 dages og 278 dages forsøg for henholdsvis søjlerne uden recirkulering og søjlerne med recirkulering. Masserne er i procent af begyndelsesmassen. Udvaske, strippet og genfundet er målte størrelser, hvorimod differencen er beregnet som forskellen mellem begyndelsesmassen og de målte størrelser.

| Jordtype                   | 1                  |         | 2                 |         |
|----------------------------|--------------------|---------|-------------------|---------|
|                            | uden recirkulering |         | med recirkulering |         |
|                            | forsøg             | kontrol | forsøg            | kontrol |
| <b>1,1,1-Triklorethan:</b> |                    |         |                   |         |
| Total:                     | 100                | 100     | 100               | 100     |
| Udvasning:                 | 2,1                | 4,7     | 17,5              | 55,1    |
| Stripning:                 | 16,2               | 22,5    | -                 | -       |
| Genfundet i jorden:        | 27,2               | 46,0    | 3,8               | 25,2    |
| Difference:                | 54,6               | 26,8    | 78,7              | 19,7    |
| <b>Trikllorethylen:</b>    |                    |         |                   |         |
| Total:                     | 100                | 100     | 100               | 100     |
| Udvasning:                 | 2,5                | 5,0     | 9,4               | 39,1    |
| Stripning:                 | 12,0               | 14,0    | -                 | -       |
| Genfundet i jorden:        | 53,1               | 68,0    | 9,2               | 39,8    |
| Difference:                | 32,5               | 13,0    | 81,4              | 21,1    |
| <b>Tetraklorethylen:</b>   |                    |         |                   |         |
| Total:                     | 100                | 100     | 100               | 100     |
| Udvasning:                 | 0,4                | 0,7     | 17,9              | 22,8    |
| Stripning:                 | 4,6                | 5,4     | -                 | -       |
| Genfundet i jorden:        | 78,9               | 89,4    | 60,0              | 56,9    |
| Difference:                | 16,2               | 4,5     | 22,1              | 20,3    |

## 2.3 KONKLUSION

De udførte batch- og søjleforsøg viste, at jorden fra den umættede zone ved Skrydstrup Specialdepot indeholdt methan-oxiderende bakterier, som kunne stimuleres ved tilsætning af methan og ilt. De methan-oxiderende bakterier var istand til at nedbryde 1,1,1-TCA og TCE men ikke PCE. Dette viser, at en biologisk nedbrydning af 1,1,1-TCA og TCE i den umættede zone er mulig. Nedbrydeligheden af de mindre klorerede ethaner og ethylen er bedre end nedbrydeligheden af 1,1,1-TCA og TCE, så hvis disse stoffer havde været tilstede i den anvendte jord, var der sikkert opnået en større nedbrydning heraf end opnået for 1,1,1-TCA og TCE.

Forsøgene afslører dog også nogle problemer med biologisk nedbrydning af klorerede alifater, som har betydning for, om metoden kan udvikles til en anvendelig afværgeteknik. I søjleforsøgene med jordtype 1 var stofferne tilstede i toksiske koncentrationer, der dels medførte en lang opformeringsfase af methan-oxiderende bakterier, og som dels medførte en delvis inhibering af methanomsætningen, da den endelig startede. Det er derfor vigtigt at være opmærksom på, at selvom de tilstedeværende stoffer er biologisk nedbrydelige, så kan de være tilstede i koncentrationer, der gør det teknisk umuligt eller uøkonomisk at anvende en biologisk rensningsteknik.

Søjleforsøgene uden recirkulering viste, at strippingen og den biologiske nedbrydning af 1,1,1-TCA og TCE var af samme størrelsesordenen. Da systemet med recirkulering er svært at etablere i fuld skala, er det nødvendigt at optimere nedbrydningshastighederne af de klorerede alifater i forhold til omsætningen af methan for at minimere tilførslen af luft og methan og derved minimere strippingen.

I søjleforsøgene med recirkulering varede det omkring et år at fjerne omkring 90% af den oprindelige mængde 1,1,1-TCA og TCE, hvoraf omkring 60% blev fjernet ved biologisk nedbrydning. Jorden indeholdt da koncentrationer af 1,1,1-TCA og TCE, der medførte væskekoncentrationer på henholdsvis 50  $\mu\text{g/l}$  og 34  $\mu\text{g/l}$ , hvilket er uacceptable koncentrationer. Derfor må det forventes at en fuldstændig biologisk rensning af den aktuelle jord vil tage flere år, idet omsætningshastighederne sandsynligvis vil falde med faldende koncentrationer af stofferne i vandfasen.

Udfra disse søjleforsøg må man konkludere, at in-situ aerob nedbrydning af klorerede alifater i den umættede zone som afværgeteknik stadig mangler at blive optimeret under realistiske forhold i laboratoriet, før teknikken kan anvendes i praksis.

### 3. AEROB NEDBRYDNING I GRUNDTVAND

Jens Aamand og Jan C. Nielsen. Afdeling for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet. Kim Broholm. Laboratoriet for teknisk Hygiejne (LtH), DTH.

Dette kapitel indeholder en beskrivelse af de laboratorieforsøg, der er blevet gennemført med henblik på at undersøge mulighederne for en aerob biologisk nedbrydning af klorerede alifater i grundvand. Forsøgene beskrevet i afsnit 3.1 er udført af Jens Aamand og Jan C. Nielsen, på AGM, og forsøgene beskrevet i afsnit 3.2, 3.3 og 3.4 er udført af Kim Broholm, på LtH.

#### 3.1 NÆRINGSSTOFFERS BETYDNING FOR NEDBRYDNINGEN AF TRIKLORETHYLEN.

##### 3.1.1 Baggrund

Mikroorganismer, der ikke er i balanceret vækst, f.eks. på grund af mangel på en næringskomponent, er udsat for en form for stress. Dette kan medføre ændringer af mikroorganismernes enzymmønster, hvor dannelsen af nogle enzymer eller enzymesystemer bliver stimuleret og andre hæmmet. Inden for den industrielle bioteknologi anvendes denne stressvirkning ofte til at fremme dannelsen af bestemte enzymesystemer, der producerer et produkt, man er interesseret i. Med baggrund i ovenstående blev det undersøgt, hvorledes stress, induceret af kobber mangel, påvirker de methan-oxiderende bakteriers nedbrydning af trikllorethylen (TCE) og 1.1.1-triklorethan (TCA).

Hos methan-oxiderende bakterier er der blevet fundet to forskellige typer methan-monoxygenase (MMO), der kan adskilles på baggrund af deres intracellulære lokalisering. Alle hidtil undersøgte methan-oxiderende bakterier er i stand til at danne et membranbundet MMO (pMMO), mens nogle arter, såsom *Methylococcus capsulatus*, også er i stand til at danne et MMO, der er fundet opløst i cellens cytoplasma (sMMO). Dette enzym induceres, hvis Cu-koncentrationen i mediet bliver vækstbegrænsende. Af de to typer MMO har sMMO den bredeste substratspecificitet (Bedard og Knowles 1989), og kan derfor forventes at have det største potentialle for nedbrydning af fremmedstoffer.

##### 3.1.2 Metoder

Anvendt kultur: Den anvendte kultur er en blandkultur opformeret fra materiale indsamlet fra Nykøbing Sjælland vandværk. På grund af forekomst af methan i grundvandet var der dannet en belægning af methan-oxiderende bakterier på siderne af vandværkets bassiner. Disse methan-oxiderende bakterier har vist sig at kunne nedbryde TCE ved grundvandstemperaturer

(8-10 °C) (Aamand et al., 1989). Bakterierne blev dyrket ved 10 °C i lukkede flasker tilsat mineralmedium og methan. Ved gentagen overførsel til nye flasker er bakteriekulturen blevet beriget. Denne berigede kultur er anvendt som inoculum ved forsøg og er opretholdt ved overførsel til nye flasker én gang om ugen. Ved exponentiel vækst voksede kulturen med en fordoblingstid på 25 timer (Nielsen et al., 1990).

Nedbrydningsforsøg: Forsøgene blev udført i 117 ml eller 585 ml flasker tilsat 30 ml henholdsvis 100 ml mineralmedium. Flaskerne var forsynede med gastætte teflonbelagte Miniert propper, og gasfasen, der bestod af atmosfærisk luft, var tilsat sterilfiltreret methan til en startmængde på 8% (vol./vol.). TCE eller 1,1,1-TCA tilsattes til en startkoncentration i væskefasen på 170-220 µg/l. Som inoculum blev anvendt to kulturer opformeret på henholdsvis kobberfrit og kobberholdigt medium. Nedbrydningen af methan, produktion af kuldioxid og fjernelse af kloreret stof blev målt gaschromatografisk.

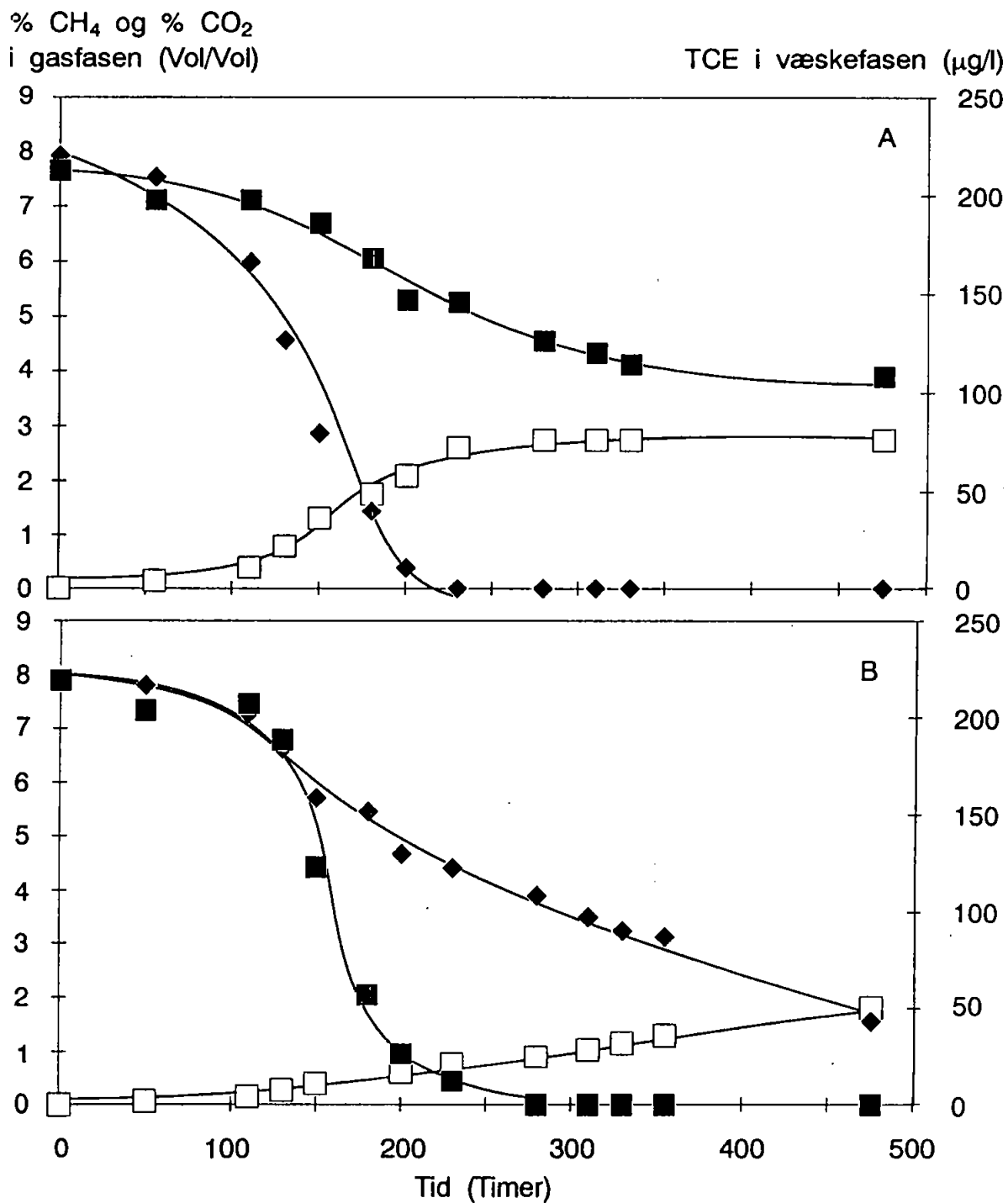
### 3.1.3 Resultater

TCE og TCA nedbrydning: I forsøg, hvor kobber var tilsat mediet (fig. 3.1A), er methanen opbrugt efter 225 timer og samtidig ophører produktionen af kuldioxid. På dette tidspunkt er ca. 30% af den tilsatte TCE nedbrudt. Nedbrydningen fortsætter dog, selv om bakterierne ikke har noget methan som primærsubstrat, og efter 475 timer er ca. 50% af den tilsatte TCE nedbrudt. I forsøg uden kobber i mediet (fig. 3.1B), er methanforbruget stigende de første 130 timer, hvorefter forbruget er konstant. Det er muligt, at der selv i det kobberfrie medie findes spormængder af kobber således, at kobbermangel først indtræder efter dette tidspunkt. Ændringen i nedbrydningsraten er i så tilfælde udtryk for, at bakterierne skifter fra et enzymsystem til et andet. Efter ca. 130 timer ses samtidigt en stigning i TCE nedbrydningsraten og efter 275 timer er TCE koncentrationen under detektionsgrænsen, mens kun halvdelen af den tilsatte methan er forbrugt.

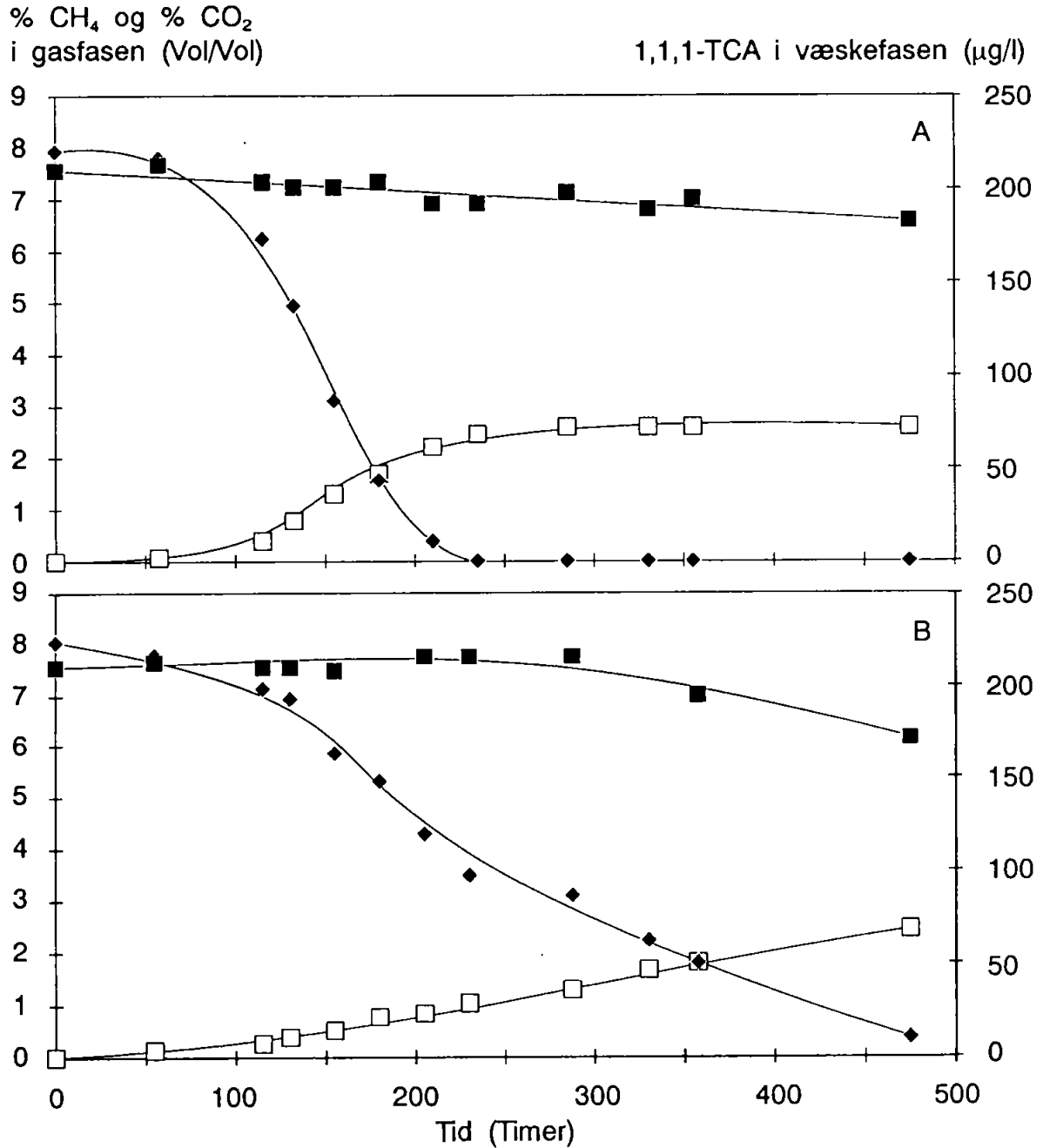
Der blev udført et tilsvarende forsøg med 1,1,1-TCA, men som det fremgår af fig. 3.2, observeredes der kun en ringe nedbrydning heraf. Den positive indvirkning, som kobbermangel har på nedbrydningen af TCE, gør sig tilsyneladende ikke gældende for nedbrydningen af TCA.

TCE nedbrydningskinetik: Nedbrydningskinetikken for TCE blev undersøgt i kulturer med og uden kobber. Desuden blev det undersøgt, om 8% (vol./vol.) methan hæmmede omsætningen af TCE. Forsøgene blev udført som korttidsforsøg med en høj biomasse, der ikke ændrede sig nævneværdigt under forsøgsperioden.

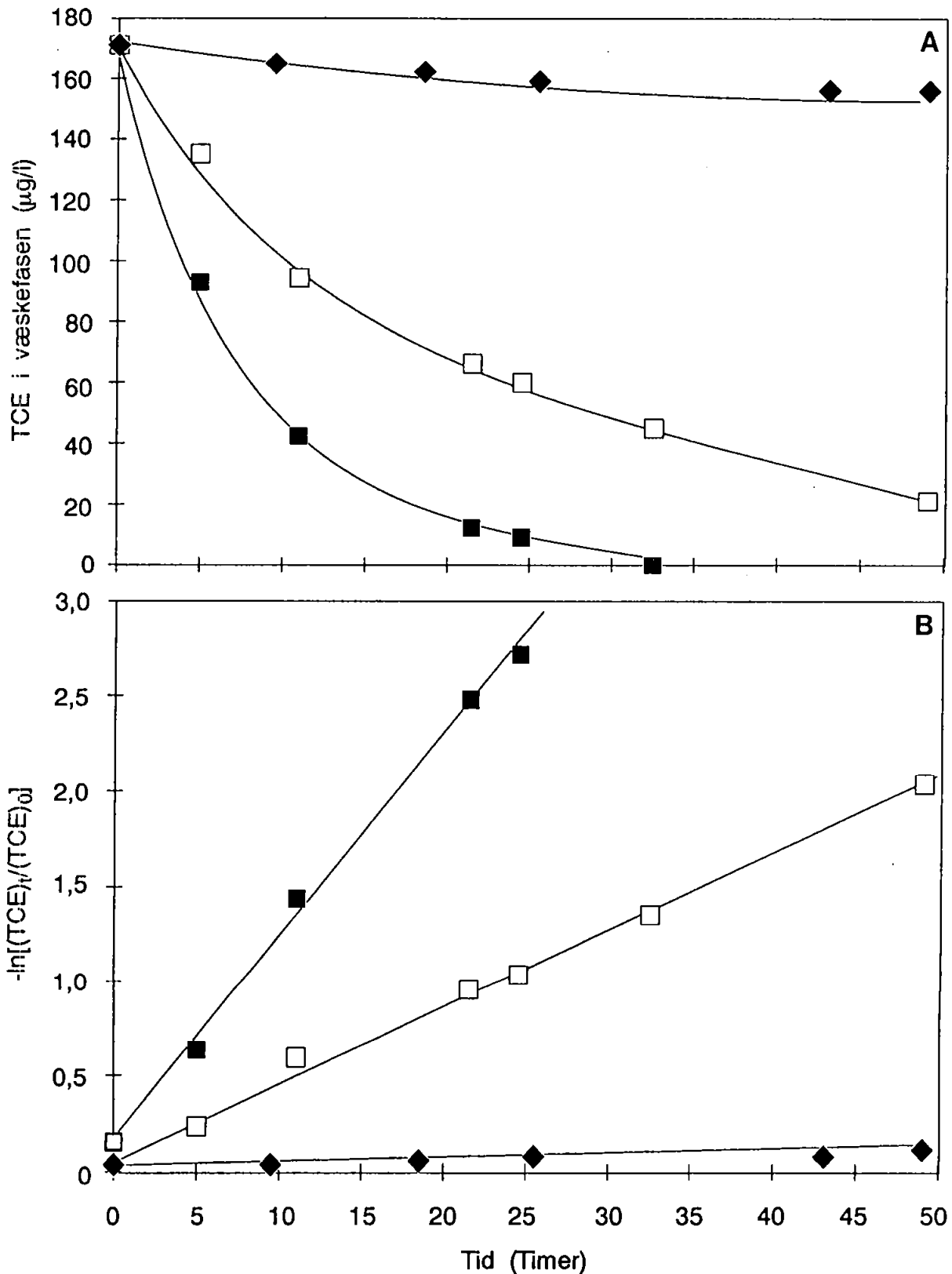
Det fremgår af fig. 3.3A, at tilstedeværelsen af methan hæmmer omsætningen af TCE, hvilket formentlig skyldes, at methan og TCE konkurrerer om det samme enzym (kompetitiv inhibering). Til sammenligning er desuden vist en kurve, hvor kobber var tilsat mediet.



Figur 3.1: Nedbrydning af TCE ved 10 °C i 585 ml flasker, der var inoculeret til en startkoncentration på 10 mg biomassetørsvægt/l medium og tilsat methan til et indhold på 8% (vol./vol.) i gasfasen. A: kultur voksende i medium indeholdende 200 µg kobber/l. B: kultur voksende uden kobber i mediet. TCE (■), methan (♦), kuldioxid (□). Resultaterne er gennemsnit af tetraplikate forsøg.



Figur 3.2: Nedbrydning af 1,1,1-TCA ved 10 °C i 585 ml flasker, der var inoculeret til en startkoncentration på 10 mg biomassetørvægt/l medium og tilsat methan til et indhold på 8% (vol./vol.) i gasfasen. A: kultur voksende i medium indeholdende 200 µg kobber/l. B: kultur voksende uden kobber i mediet. TCA (■), methan (◆), kuldioxid (□). Resultaterne er gennemsnit af tetraplikate forsøg.



Figur 3.3: A: Nedbrydning af TCE ved 10 °C i 117 ml flasker. B: 1. ordens kinetik til beskrivelse af nedbrydningsforløb. Som beregningsgrundlag er anvendt resultaterne fra (A). TCE i kultur uden kobber tilsat mediet og med 101 mg biomassetørvægt/l medium (■), TCE i kultur uden kobber tilsat mediet og med 101 mg biomassetørvægt/l medium og 8% (vol./vol.) methan tilsat gasfasen (□), TCE i kultur med 200 µg kobber/l medium og med 115 mg biomassetørvægt/l medium (◆). Resultaterne er gennemsnit af triplikate forsøg.



Tabel 3.1 Beregnede korrelationskoefficienter og k-værdier for resultaterne i figur 4. Ved beregning af k er anvendt  $a = k \cdot x$ , hvor a er liniens hældningskvotient og x er biomassetørvægt/ml medium.

|                    | Korrelationskoefficient | k (ml mg <sup>-1</sup> time <sup>-1</sup> ) | k' (for holdstal) |
|--------------------|-------------------------|---|-------------------|
| Kultur med kobber  | 0,983                   | 0,012                                       | 1                 |
| Kultur uden kobber | 0,996                   | 1,056                                       | 88                |
| 8% (vol./vol.)     | 0,997                   | 0,390                                       | 33                |

Nedbrydningsforløbene i fig. 3.3A er forsøgt beskrevet med 1. ordenskinetik, d.v.s. at nedbrydningshastigheden skal være proportional med TCE koncentrationen. Som udgangsformel blev anvendt:

$$-d[\text{TCE}]/dt = k \cdot X [\text{TCE}]$$

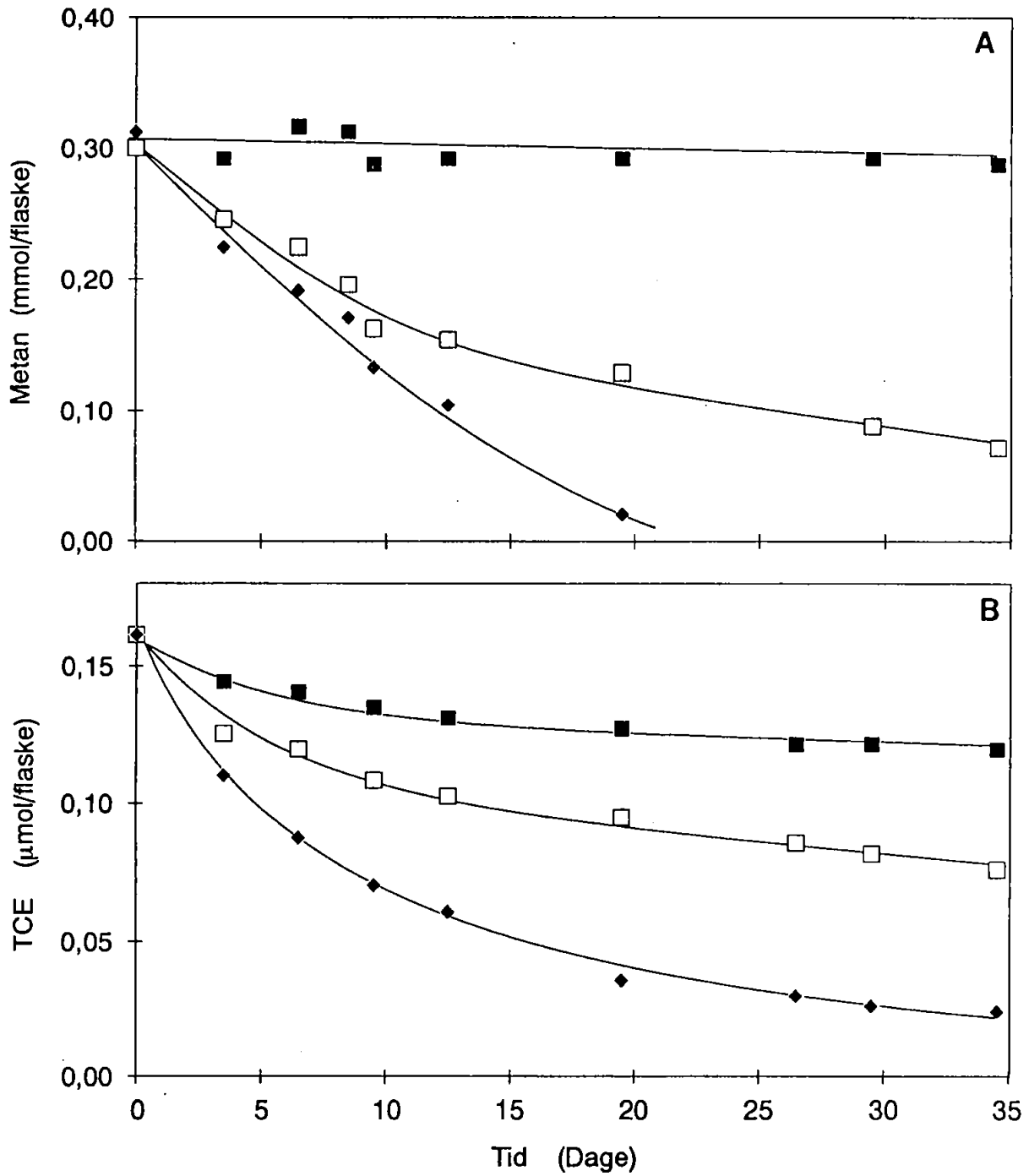
hvor X er biomassetørvægt (mg/ml), der forudsættes konstant, t er tiden (timer) og k er en 1. ordens rate konstant (ml/mg/time). Ved at integrere med hensyn til tiden fås:

$$-\ln([\text{TCE}]_t/[\text{TCE}]_0) = k \cdot X \cdot t$$

Hvis nedbrydningen af TCE følger 1. ordens kinetik, vil en afbildning af  $\ln([\text{TCE}]_t/[\text{TCE}]_0)$  mod t give en ret linie. Med resultaterne fra fig. 3.3A som beregningsgrundlag, er disse plot vist på fig. 3.3B. Det ses, at nedbrydningen følger 1. ordens kinetik. Da biomassen forudsættes konstant i forsøgsperioden, er det muligt at beregne k. De beregnede værdier er vist i tabel 3.1, hvoraf det fremgår, at kulturen uden tilsat kobber er i stand til at nedbryde TCE 88 gange mere effektivt end kulturen med tilsat kobber. Tilsætning af 8% (vol./vol.) methan mere end halverer nedbrydningseffektiviteten af TCE (tabel 3.1).

Nedbrydning af TCE i grundvand: Det er ikke altid, at mangel på næringsstoffer kan forventes at fremme nedbrydningen af TCE. I de fleste tilfælde vil næringsmangel medføre begrænsninger i de methan-oxiderende bakteriers vækst og dermed en begrænset nedbrydning af kloreret stof.

I fig. 3.4 ses resultaterne af en undersøgelse, hvor den før beskrevne kultur er dyrket på henholdsvis et mineralmedium og grundvand fra Skrydstrup. Formålet med undersøgelsen var at bestemme, om en kultur opformeret i laboratoriet og med stort potentiale for TCE nedbrydning kunne overføres til grundvandsmiljøet (Jørgensen, 1990). Det ses, at nedbrydningsraterne for både methan og TCE er størst, når kulturen vokser på mineralmediet. Årsagen til dette er sandsynligvis, at bakterierne er næringssaltbegrænsede, når de vokser



Figur 3.4: (A): Nedbrydning af methan og (B): Nedbrydning af TCE ved 10 °C i 117 ml flasker der blev inoculeret til en startskoncentration på 7 mg biomassetørvægt/l medium. Bakterier voksende i mineralmedie (♦), bakterier voksende i grundvand (□) og kontrolflasker (■) (efter Jørgensen 1990).

Tabel 3.2 pH, næringssalte og totalt organisk kulstof målt i grundvandet fra Skrydstrup og i næringssaltmedie (NMS)

| Parameter                             | Grundvand | NMS   | Forhold (me-<br>die:gr) |
|---------------------------------------|-----------|-------|-------------------------|
| pH                                    | 7,4       | 6,8   |                         |
| Calcium      mg Ca/l                  | 100       | 71    | 0,7                     |
| Magnesium    mg Mg/l                  | 5         | 99    | 20                      |
| Natrium        mg Na/l                | 6,2       | 44    | 7                       |
| Kalium         mg K/l                 | 0,5       | 430   | 850                     |
| Ammonium     mg NH <sub>4</sub> /l    | 0,11      | 0     | -                       |
| Fosfor total    mg P/l                | 0,06      | 124   | 2000                    |
| Nitrogen total mg N/l                 | 4,1       | 138   | 30                      |
| Jern            mg Fe/l               | 0,13      | 0,11  | 0,8                     |
| Mangan        mg Mn/l                 | 0,16      | 0,06  | 0,4                     |
| Chlorid        mg Cl/l                | 23        | 126   | 5                       |
| Sulfat         mg SO <sub>4</sub> /l  | 50        | 390   | 8                       |
| Nitrat          mg NO <sub>3</sub> /l | 20        | 614   | 30                      |
| Kobber         mg Cu/l                | 0,001     | 0,051 |                         |
| Tot. org. C    mg TOC/l               | 2         | 0     | -                       |

i rent grundvand. Tabel 3.2 angiver koncentrationen af vigtige næringsioner i både grundvandet og mineralmediet. Koncentrationen af fosfor er normal for grundvand (Warncke 1980) men kritisk i forhold til bakteriernes vækstkrav. Den lave fosforkoncentration kan være årsag til, at der opnåes lavere nedbrydningsrater med rent grundvand.

Det var ikke muligt at påvise aktivitet af methan-oxiderende bakterier eller nedbrydning af TCE i grundvandssedimentet ved Skrydstrup specialdepot (Aamand et al., 1989). Dette kan hænge sammen med redoxforholdene i grundvandsreservoiret. Den øverste del af magasinet er aerobt og dybere nede findes både nitrat og sulfat (DGU 1988). Da der samtidigt er et lavt indhold af organisk kulstof, er betingelserne for anaerobe methanproducerende lag ringe (se iøvrigt kap 4). Fravær af dybere liggende methanproducerende lag fjerner vækstgrundlaget for de methan-oxiderende bakterier.

### 3.1.4 Diskussion

Lavere klorerede forbindelser kan nedbrydes aerobt af methan-oxiderende bakterier. Processen forløber cometabolisk, idet methan er nødvendig for at inducere enzymet methan monooxygenase. Dette enzym varetager samtidig omdannelsen af de klorerede stoffer. Da TCE og methan konkurrerer om det samme enzym favoriseres nedbrydningen af TCE ved fravær af methan. Methan er dog nødvendig for at opformere de methan-oxiderende bakterier og for reinduktion af MMO. I de her beskrevne forsøg opretholdes kulturens evne til at nedbryde TCE mindst 48 timer efter at methanen er omsat.

Fravær af kobber inducerer den opløselige form af MMO, der har lavere substratspecificitet end den partikulære form. Det var derfor muligt at øge nedbrydningsraten anseligt (88 gange) ved at udsætte bakterierne for kobberbegrænsning. Kobberkoncentrationer under  $0.25 \mu\text{M}$  kan forventes at medføre induktion af den opløselige form af MMO (Tsien et al., 1989).

Nedbrydningen af TCE forløber ved 1. ordens kinetik hvilket vil sige, at nedbrydnings-hastigheden af TCE er proportional med TCE koncentrationen. Det vil derfor kræve en uhensigtsmæssig lang retentionstid i f.eks. et on-site vandbehandlingsanlæg, hvis den sidste rest af TCE skal fjernes. Det kan derfor anbefales at tilkoble et aktivt kul filter eller luftstripping til et sådant anlæg for at fjerne de sidste spor af kloreret stof.

In-situ oprensning af grundvandet ved Skrydstrup ved aerobe mikrobielle processer vil være vanskeligt. Dels består den overvejende del af forureningen af 1,1,1-TCA, der kun vanskeligt nedbrydes under aerobe forhold, og dels indeholder grundvandsmagasinet ikke en naturlig population af methan-oxiderende bakterier.

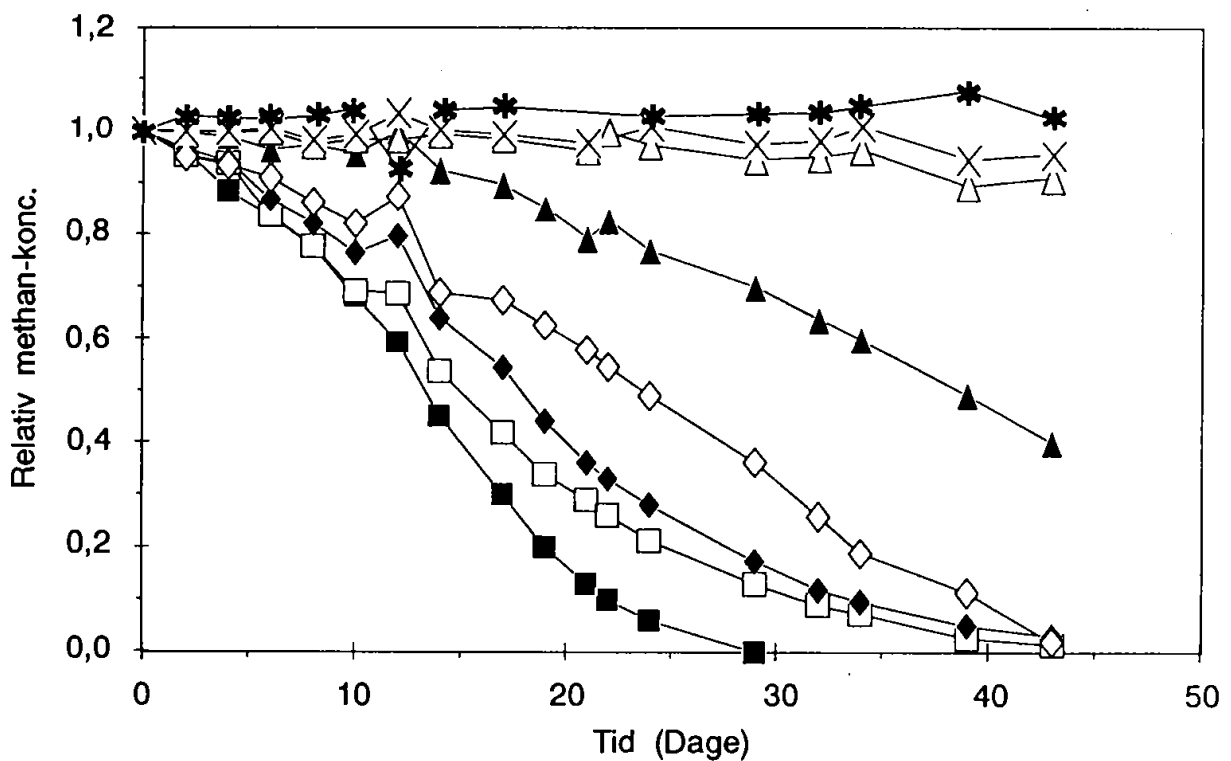
## 3.2 TOXICITETEN AF 1,1,1-TCA OG TCE

Et generelt problem med biologisk rensning af jord og grundvand er, hvorvidt stofferne er tilstede i toksiske koncentrationer, der medfører en inhibering af bakterierne, og derved gør en biologisk rensning umulig.

Søjleforsøgene, der er udført med henblik på at vurdere om en biologisk in-situ nedbrydning af klorerede alifater i den umættede zone er mulig, afslørede, at den mest forurenede umættede jord ved Skrydstrup Specialdepot måske indeholdt koncentrationer af især 1,1,1-TCA og TCE, der havde en inhiberende effekt på de methan-oxiderende bakterier. Der findes ingen litteratur onhandlende den toksiske effekt af klorerede alifater på methan-oxiderende bakterier, så der blev gennemført en række bachtforsøg med det formål at undersøge toxiciteten af 1,1,1-TCA og TCE på methan-oxiderende bakterier. Resultaterne af dette forsøg er detaljeret beskrevet i Broholm et al., (1990)

### 3.2.1 Forsøgsopstilling

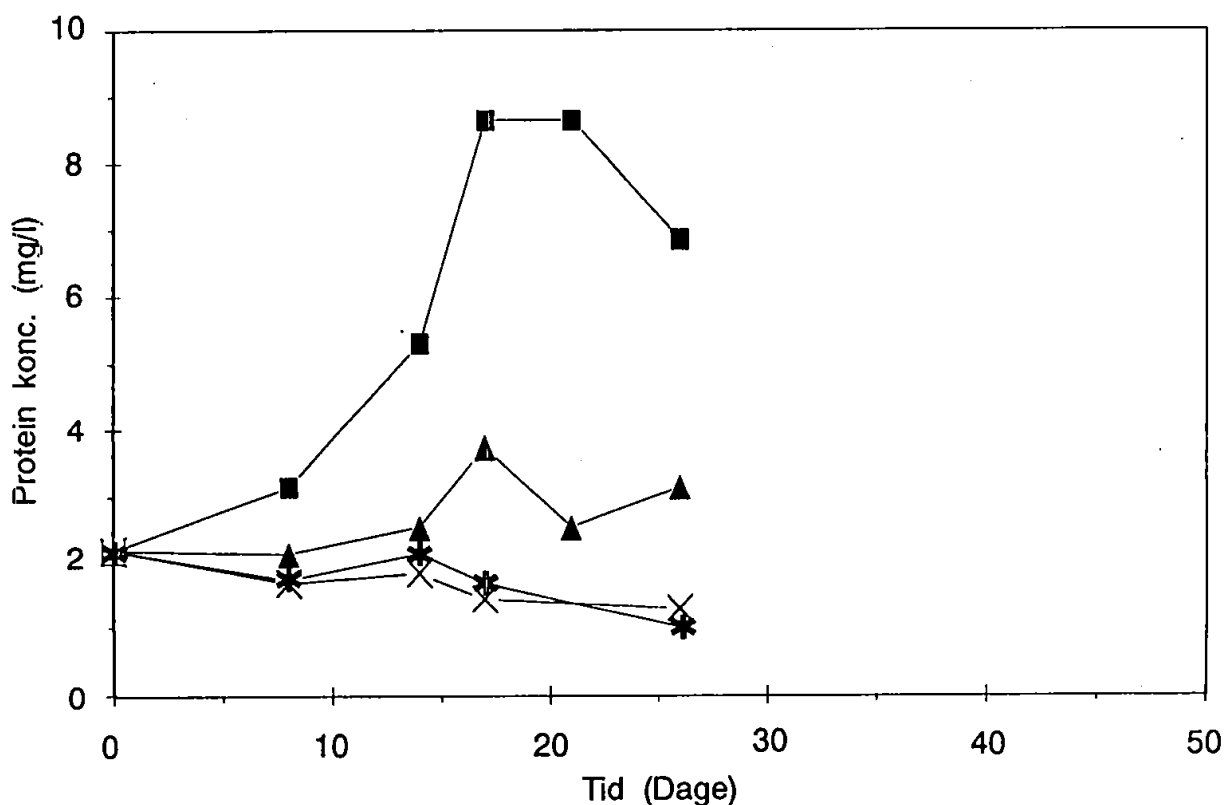
Forsøgene blev udført i 117 ml glasflasker med Miniert propper. Flaskerne indeholdt 10 eller 20 ml næringssaltopløsning og bakteriekultur. Bakteriekulturen var en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier, der voksede på methan som eneste energi- og kulstofkilde. Kulturen var opformeret fra søsediment udtaget i Lyngby Sø. TCE eller 1,1,1-TCA blev tilsat i varierende koncentrationer mellem 0 og 103 mg/l i væskefasen og methan i en begyndelseskoncentrationer på 1,8% (vol./vol.) af headspace. Der blev tilsat 0,3 g natriumazide ( $\text{NaN}_3$ ) til kontrolflaskerne for at undgå biologisk aktivitet. Flaskerne blev inkuberet i mørke ved  $10^\circ\text{C}$ . Alle forsøg blev udført i dublikat eller triplikat. Under forsøget blev der udtaget luftprøver, som blev analyseret for methan på en gaskromatograf forsynet med flamme ionisering detektor, og for TCE/1,1,1-TCA på en gaskromatograf forsynet med en elektron capture detektor. Ved nogle af forsøgene målte protein for at følge væksten af bakterierne undervejs.



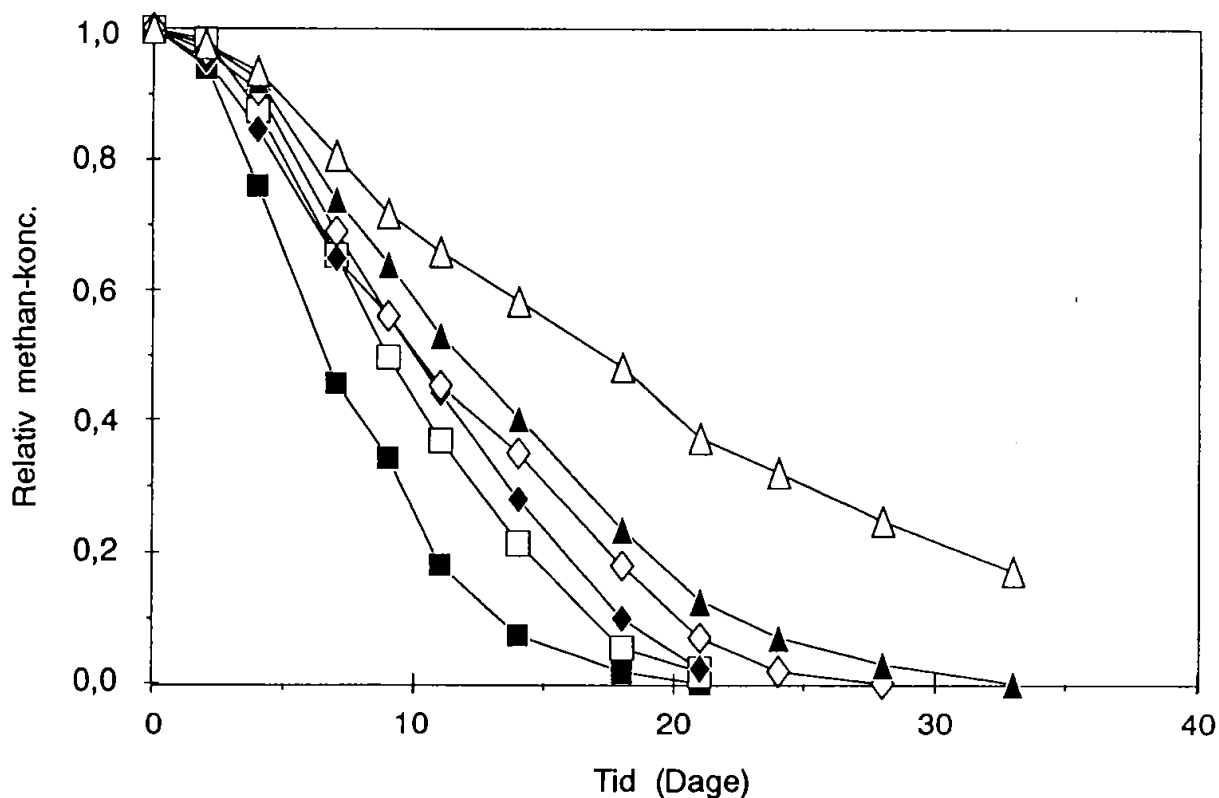
Figur 3.5: Nedbrydningen af methan i et batchforsøg med en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier med følgende koncentrationer af TCE i mg/l: 0 (■), 0,3 (□), 1,7 (◆), 3,1 (◇), 6,5 (▲), 13 (△), 23 (x) og 65 (\*). Begyndelseskoncentrationen af methan var 0,45 mg/l og af protein 2 mg/l. Resultaterne er gennemsnit af triplikate forsøg. Forholdet mellem vand og luft var 10:107.

### 3.2.2 Resultater

Figur 3.5 viser nedbrydningen af methan ved forskellige TCE koncentrationer mellem 0 og 65 mg/l. Den tilsvarende vækst af bakterier målt som protein er for 4 koncentrationsniveauer vist i figur 3.6. Den hurtigste methanomsætning og kraftigste vækst observeres i forsøget uden TCE. Methanomsætningen falder for stigende koncentrationer op til 13 mg/l, hvor en fuldstændig inhibering af methanomsætningen indenfor 43 dage observeredes. Et tilsvarende fald i væksten af bakterier observeredes for stigende koncentrationer af TCE. I forsøget observeres en TCE nedbrydning mellem 13 og 22% ved TCE koncentrationer op til 6,5 mg/l. Ved højere koncentrationer af TCE observeredes ingen nedbrydning af TCE, hvilket er i overensstemmelse med, at der heller ikke observeredes nogen omsætning af methan ved disse koncentrationer af TCE.



Figur 3.6: Væksten af en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier målt som protein i et batchforsøg med følgende koncentrationer af TCE i mg/l: 0 (■), 6,5 (▲), 23 (x) og 65 (\*). Resultaerne er gennemsnit af duplikate forsøg. Den tilsvarende omsætning af methan er vist i figur 1.



Figur 3.7: Nedbrydningen af methan i et batchforsøg med en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier med følgende koncentrationer af 1,1,1-TCA i mg/l: 0 (■), 1 (□), 8,6 (◆), 24 (◇), 48 (▲) og 103 (△). Begyndelseskonsentrationen af methan var 0,45 mg/l og af protein 2 mg/l. Resultaterne er gennsesnit af triplikate forsøg. Forholdet mellem vand og luft var 20:97.

Figur 3.7 viser nedbrydningen af methan ved forskellige koncentrationer af 1,1,1-TCA mellem 0 og 103 mg/l. Også for 1,1,1-TCA observeredes den hurtigste methanomsætningen uden 1,1,1-TCA, og der blev observeret en faldende methanomsætning ved stigende koncentrationer af 1,1,1-TCA. For 1,1,1-TCA observeredes ingen total inhibering af methanomsætningen selv ved den højeste 1,1,1-TCA koncentration på 103 mg/l. Der skete ingen nedbrydning af 1,1,1-TCA i dette forsøg indenfor den anvendte forsøgsperiode.

Både for 1,1,1-TCA og TCE blev der observeret en langsommere methanomsætning ved stigende koncentrationer af 1,1,1-TCA/TCE. Dette kunne tyde på, at der er en konkurrence mellem methan og 1,1,1-TCA/TCE, som muligvis skyldes competitiv inhibering. For at undersøge dette nærmere opstilles en matematisk model for omsætningen af methan og væksten af methan-oxiderende bakterier.

Omsætningshastigheden for methan kan beskrives med følgende Monod ligning, der inddrager competitiv inhibering (Borden og Bedient, 1986; Bailey og Ollis, 1977, Strand et al., 1990), og er tilpasset et to-fase (vand/luft) batchsystem:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_L}{(V_L + V_A F)} X k_s \frac{S}{S + K_s (1 + \frac{C}{K_c})} \quad (1)$$

Faktoren  $V_L/(V_L + V_A F)$  tager hensyn til, at methan fordeles mellem luft- og væskefasen, men kun omsættes i væskefasen, hvor bakterierne er. Væksten af bakterier kan beskrives ved følgende ligning, der tager hensyn til henfald af bakterierne (Borden og Bedient, 1986):

$$\frac{dX}{dt} = Y k_s X \frac{S}{S + K_s (1 + \frac{C}{K_c})} - b X \quad (2)$$

hvor C og S er koncentrationen af henholdsvis TCE og methan (mg/l); X er koncentrationen af biomasse (mg protein/l);  $k_s$  er den maksimale methanomsætningshastighed (mg methan/mg protein/dag);  $K_s$  er halvmætningskonstanten for methan (mg/l);  $K_c$  er halvmætningskonstanten for TCE (mg/l); b er bakteriernes henfaldskonstant ( $\text{dag}^{-1}$ ); Y er bakteriernes udbyttekonstant (mg protein/mg methan);  $V_L$  og  $V_A$  er volumenet af henholdsvis væske- og luftfase i batchforsøget (l); F er fordelingskoefficienten mellem luft og vand for methan.

Ligning 1 og 2 løses ved en simpel numerisk metode. De observerede methanomsætningskurver simuleres med de to ligninger for at estimere de indgående parameter. Y, b,  $K_s$  og  $k_s$  estimeres udfra de forsøg, hvor der ikke er TCE eller 1,1,1-TCA, hvorimod den sidste parameter  $K_c$  estimeres udfra samtlige forsøg, hvor der er enten TCE eller 1,1,1-TCA. I tabel 3.3 er de estimerede parametre vist sammen med værdier fundet i litteraturen.

Figur 3.8 og 3.9 viser de bedste simuleringer af de observerede methankurver ved forskellige koncentrationer af henholdsvis TCE og 1,1,1-TCA. For de observerede methankurver ved forskellige koncentrationer af TCE stemmer simuleringerne rimeligt overens med de målte kurver (se figur 3.8), hvorimod simuleringerne overhovedet ikke fitter de observerede methankurver for forskellige 1,1,1-TCA koncentrationer. Dette viser, at TCE's inhibering af methanomsætningen sandsynligvis skyldes competitiv inhibering, hvorimod 1,1,1-TCA's inhibering af methanomsætningen skyldes en anden mekanisme eller en kombination af flere mekanismer.

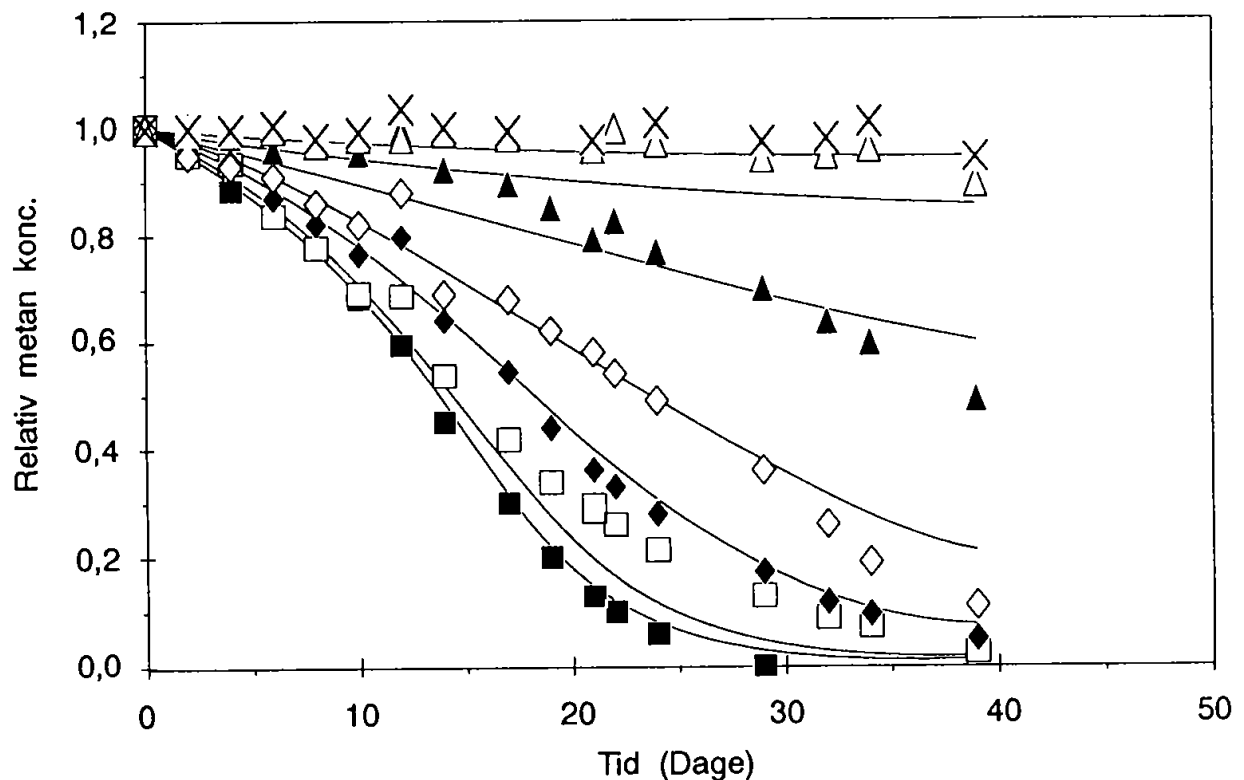


TABEL 3.3: Estimerede vækstkonstanter for en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier ved 10°C, og litteraturværdier.

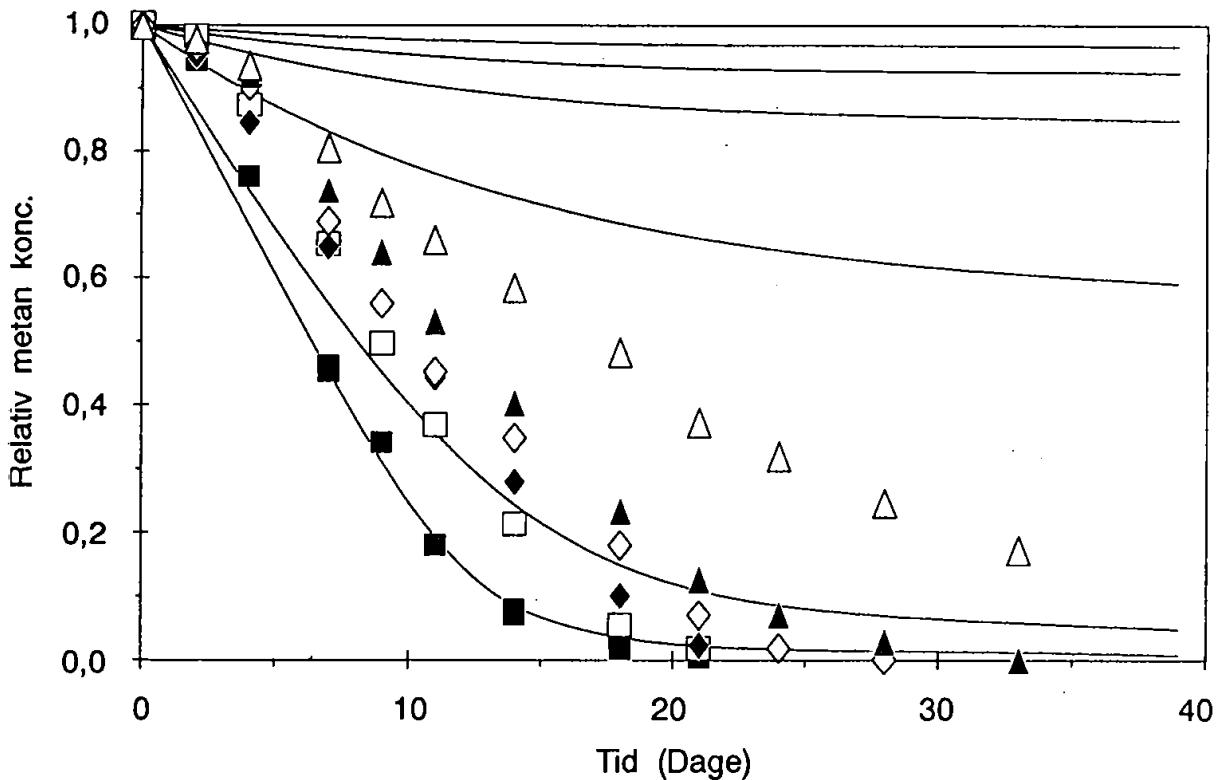
| Parameter   | Estimerede værdier | Litteraturværdier* | Referencer    |
|---|--------------------|--------------------|---------------|
| Udbyttekonstant, Y,<br>mg protein/mg methan                       | 0,2                | 0,26-0,55          | c, d, e, f, h |
| Maksimal omsætningshastighed, $k_s$ ,<br>mg methan/mg protein/dag | 1,72               | 3,6-10             | d, e          |
| Halvmætningskonstant, $K_s$ ,<br>mg methan/l                      | 0,2                | 0,24-0,42          | a, b, g       |
| Henfaldskonstant, b,<br>dag <sup>-1</sup>                         | 0,12               | 0,33-0,4           | d             |

\*: De fleste litteraturværdier er baseret på biomassemålinger som mg TS/l, og omregnet til protein, idet en omregningsfaktor på 0,5 mg protein/mg TS (Nester et al., 1983). De fleste værdier er fundet ved temperaturer højere end 30°C.

a: Ferenci et al., (1975); b: Harrison, (1973); c: Harwood og Pirt, (1972); d: Heijnen og Roels, (1981); e: Morinaga et al., (1979); f: Whittenbury et al., (1970); g: Wilkinson og Harrison, (1973) h: Wilkinson et al., (1974)



Figur 3.8: Simuleringer (—) med en matematisk model af nedbrydningen af methan (se figur 3.5) med følgende koncentrationer af TCE i mg/l: 0 (■), 0,3 (□), 1,7 (◆), 3,1 (◇), 6,5 (▲), 13 (△) og 23 (x). Parametrene anvendt i modellen er angivet i tabel 1.



Figur 3.9: Simuleringer (—) med en matematisk model af nedbrydningen af metan (se figur 3.7) med følgende koncentrationer af 1,1,1-TCA i mg/l: 0 (■), 1 (□), 8,6 (◆), 24 (◇), 48 (▲) og 103 (△). Parametrene anvendt i modellen er angivet i tabel 1.

### 3.2.3 Diskussion

TCE inhiberede methanomsætningen fuldstændigt ved en koncentration på 13 mg/l, hvorimod 1,1,1-TCA ikke inhiberede methanomsætningen totalt ved den højeste undersøgte koncentration på 103 mg/l. Der observeredes for både TCE og 1,1,1-TCA en stigende inhibering for stigende koncentrationer af både TCE og 1,1,1-TCA.

En model til beskrivelse af methanomsætningen og væksten af bakterier afslørede, at TCE's inhibering af methanomsætningen sandsynligvis skyldes competitiv inhibering, hvorimod TCA's inhibering af methanomsætningen ikke kunne simuleres med den anvendte model, hvorfor TCA's inhibering må skyldes en anden mekanisme eller en kombination af andre mekanismer.

I tabel 3.4 er væskekoncentrationerne af TCE på 13 mg/l og 1,1,1-TCA på > 103 mg/l, der forårsager en fuldstændig inhibering omregnet til jordkoncentrationer. Sammenlignes disse værdier med de koncentrationer, der fandtes i jordtype 1, som blev anvendt i søjleforsøgene

med umættet jord, ses, at den toksiske effekt observeret i søjleforsøgene kan skyldes de tilstedeværende koncentrationer af TCE og måske 1,1,1-TCA.

TABEL 3.4: Omregning af væskekoncentrationer af 1,1,1-TCA og TCE, der medfører en effekt på methan-oxiderende bakterier, til tilsvarende jordkoncentrationer. Fordelingskoefficienten  $K_d$  mellem jord og vand estimeres ud fra oktanol/vand-forholdet  $K_{ow}$  og jordens indhold af organisk kulstof.

| Stof                | Vandkonc. <sup>a</sup><br>(mg/l) | $\log(K_{ow})$ | $K_d$ <sup>b</sup><br>(l/kg) | Jordkonc. <sup>c</sup><br>(mg/kg TS) |
|---------------------|----------------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Trikllorethylen     | 13                               | 2,29           | 0,12                         | 1,6                                  |
| 1,1,1-Trikllorethan | > 103                            | 2,2            | 0,10                         | > 10                                 |

<sup>a</sup>: typiske vandkoncentrationer af klorerede alifater, der medfører en effekt (se tekst)

<sup>b</sup>: estimeret ud fra formelen:  $K_d = 0,63 \cdot f_{oc} \cdot K_{ow}$ , hvor  $f_{oc}$  er jordens indhold af organisk kulstof, som er sat til 0,1%, typisk indhold i en grundvandsakvifer.

<sup>c</sup>: beregnet ud fra formelen:  $S = K_d \cdot C$ , hvor S og C er henholdsvis jord- og væskekoncentrationen.

### 3.3 ANVENDELSE AF FORSKELLIGE PRIMÆRSUBSTRATER

I dette afsnit vil forskellige substrater for methan-oxiderende bakterier blive vurderet m.h.t. deres potentiale for at understøtte den cometaboliske nedbrydning af TCE. Andre grupper af bakterier, der kan anvende f.eks. toluen, phenol eller ammonium som primærsubstrater til nedbrydningen af TCE, er beskrevet i afsnit 1.3.1.

Nedbrydningen af methan forløber via methanol til formaldehyd, som enten assimileres i bakteriel biomasse eller mineraliseres til kuldioxid (se figur 1.2). Dette bevirker, at de methan-oxiderende bakterier udover methan kan udnytte methanol og formaldehyd som energi- og kulstofkilde, hvorimod format kun kan anvendes som energikilde.

Formålet med at anvende andre primær substrater end methan er dels at undgå den inhiberende effekt methan har på nedbrydningen af TCE og dels at finde et substrat, der har en større opløselighed i vand end methan. Methans opløselighed i vand er kun 24 mg/l (ved 20°C), hvilket begrænser mulighederne for at tilføre tilstrækkelige mængder methan via vandfasen. Både methanol og format er blandbare med vand.

#### 3.3.1 Forsøgsopstilling

Forsøgene blev udført i 117 ml glas flasker med Miniert propper. Flaskerne indeholdt 20 ml næringssaltopløsning, der blev podet med bakteriekultur. Bakteriekulturerne var blandingskulturer, som voksede med methan som eneste energi- og kulstofkilde. Kulturerne var enten

opformeret fra et søsediment (Lyngby Sø) eller slam/filtermateriale fra forskellige vandværker. TCE blev tilsat forsøgene i startkoncentrationer på mellem 100 og 500  $\mu\text{g/l}$ . Methan blev tilsat forsøgene i en startkoncentration på 3,6% (vol./vol.) svarende til 0,17 mmol/flaske. I forsøgene med methanol eller format blev ligeledes tilsat 0,17 mmol/flaske. Flaskerne blev inkuberet i mørke ved 10°C. Til kontrolflasker blev tilsat 0,3 g natriumazid/l for at hindre biologisk aktivitet. Koncentrationen af methan, methanol og format blev målt på luft- eller vandprøver, som blev analyseret på en gaschromatograf udstyret med Flamme Ioniserings Detektor (FID). TCE blev målt på luftprøver, som blev analyseret på en gaschromatograf udstyret med Elektron Capture Detektor (ECD).

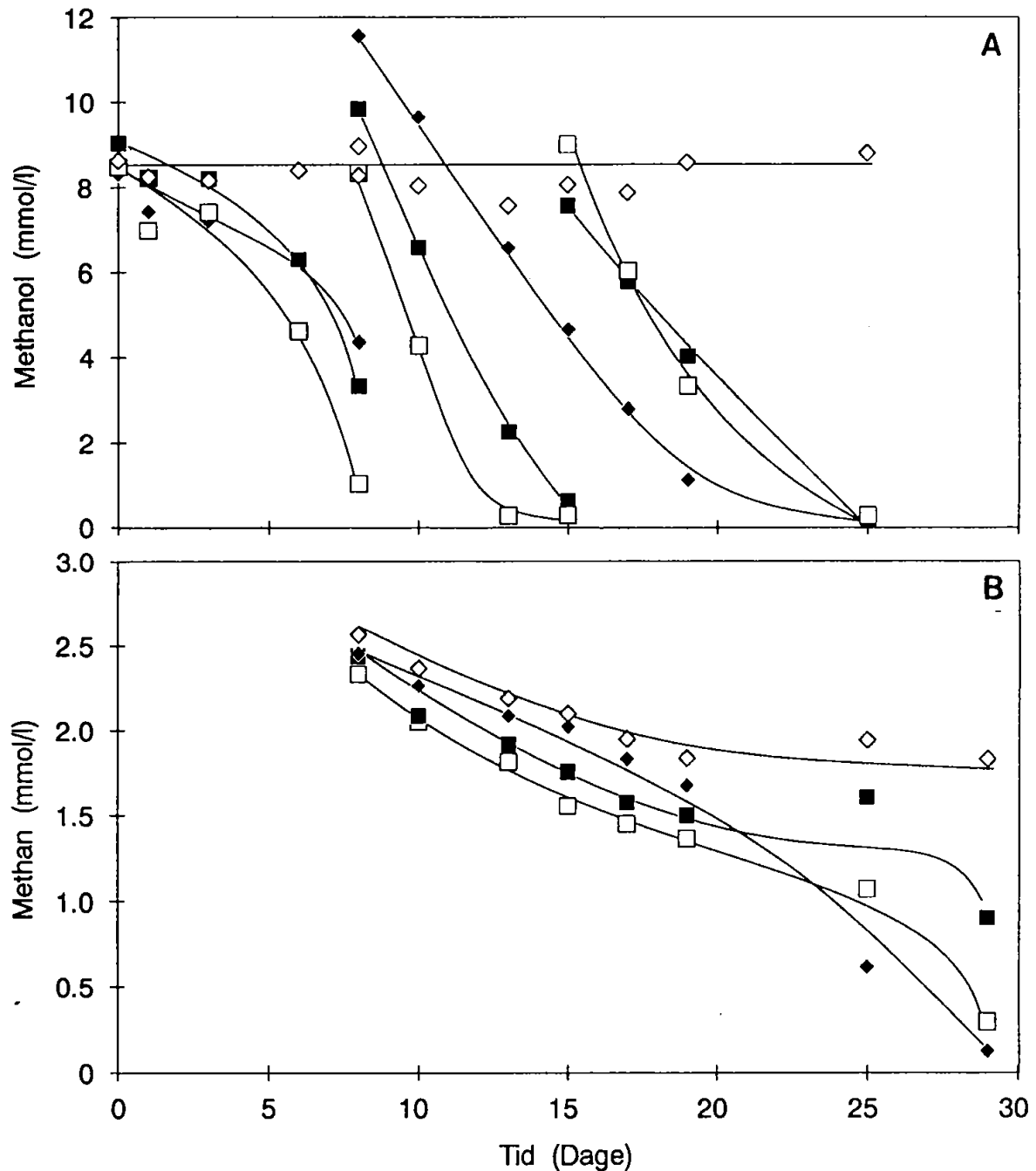
### 3.3.2 Resultater

Forsøg med en blandingskultur opformeret fra søsediment fra Lyngby Sø og en blandingskultur opformeret fra materiale udtaget på et vandværk afslørede, at kulturen fra vandværket var istand til at nedbryde TCE med methanol som primærsubstrat. Nedbrydningen var hurtigere med methanol som primærsubstrat end med methan. Dette kan skyldes, at der i forsøget med methanol ikke var nogen konkurrence mellem TCE og primærsubstratet (methanol), som der var i forsøget med methan. Det skal dog bemærkes, at det ikke var muligt at gentage dette forsøg på trods af, at vækstbetingelser og forsøgsomstændigheder var de samme. Format medførte ingen nedbrydning af TCE for nogen af kulturene.

8 forskellige blandingskulturer af methan-oxiderende bakterier opformeret fra materiale udtaget på forskellige vandværker blev anvendt i et forsøg, hvor de dels voksede på methan og dels voksede på methanol. Forsøgene er beskrevet i detaljer i Broholm et al. (1991). Forsøgene viste, at ingen af disse kulturer kunne nedbryde TCE i længere tid med methanol som primær substrat. 3 af kulturene var istand til at nedbryde TCE de første 5 dage med methanol, hvorefter nedbrydningen af TCE stoppede. Bakterierne fortsatte med at omsætte methanol også efter dette tidspunkt. I perioden, hvor bakterierne voksede på methanol, forløb nedbrydningen af TCE hurtigere end i forsøgene med methan som primærsubstrat. Grunden til at nedbrydningen af TCE stoppede, er sandsynligvis, at MMO ikke induceres, når bakterierne vokser på methanol. MMO er det enzym, der katalyserer nedbrydningen af både methan og de klorerede alifater. Fra litteraturen kendes kun få eksempler på renkulturer af methan-oxiderende bakterier, som er i stand til at bevare aktiviteten af MMO i perioder, hvor bakterierne vokser på methanol (Best og Higgins, 1981).

Det blev forsøgt at skifte mellem primærsubstraterne methanol og methan. Resultatet for 3 forskellige blandingskulturer af methan-oxiderende bakterier er vist i figur 3.10. Bakterierne levede på methan indtil dag 0, hvorefter der blev skiftet til methanol. Igennem de første 8 dage observeredes en hurtig methanolomsætning, men ingen nedbrydning af TCE. På dag 8 blev tilsat en lille mængde methan samt methanol. Efter dag 8 observeredes ingen væsentlig nedbrydning af methan, hvorimod methanol fortsat blev forbrugt. Først ved omkring dag 20-30 observeredes en signifikant nedbrydning af methan og en lille omsætning af TCE. En

tolkning af dette forløb er, at methanolen i begyndelsen giver anledning til vækst af andre bakterier end methan-oxiderende bakterier. Ved dag 8 er andelen af methan-oxiderende bakterier så lille, at det tager en periode på 10-15 dage, før at en væsentlig methan-oxiderende biomasse er opbygget.



Figur 3.10: Koncentrationen af methanol (A) og methan (B) som funktion af tiden i 3 blandingskulturer af methan-oxiderende bakterier. Kulturerne har fået numrene: 4(■), 5A(□) og 7(◆). For at standse mikrobiel vækst blev der til kontrolflaskerne (◇) tilsat 0.3 g natriumazid. Bakterierne voksede på methanol fra dag 0 til dag 8. På dag 8 tilsattes methan og methanol og på dag 15 retilsattes der igen methanol. Koncentrationen af methan er beregnet som om al methanen var i væskefasen.

### 3.3.3 Konklusion

Laboratorieforsøgene afslørede, at selvom methanol og format i henhold til nedbrydningsvejen for methan begge skulle kunne anvendes som substrater for methan-oxiderende bakterier, kunne der ikke opnås nogen nedbrydning af TCE med methanol eller format i de undersøgte blandingskulturer.

De methan-oxiderende bakterier tabte evnen til at omsætte TCE efter nogle få dage, når de levede på methanol. Dette skyldes sandsynligvis, at det ansvarlige enzym for omsætningen af methan og TCE (MMO) skal induceres af methan.

Forsøgene viste desuden, at det ikke er muligt at fremme nedbrydningen af TCE ved tilsætning af methan til kulturer, der har vokset på methanol. Dette skyldes, at methanol understøtter vækst af andre bakterier end methan-oxiderende bakterier.

## 3.4 NEDBRYDNINGSKINETIK

For at optimere nedbrydningen af de klorerede alifater er det nødvendigt at kende sammenhængen mellem nedbrydningen af de klorerede alifater og nedbrydningen af methan. I afsnit 3.2. blev der opstillet en model for indflydelsen af TCE/1.1.1.-TCA på nedbrydningen af methan og væksten af de methan-oxiderende bakterier. I dette afsnit vil denne model blive udvidet til også at omfatte nedbrydningen af klorerede alifater. Specielt vil en sammenhæng mellem nedbrydningen af TCE og methan blive udledt. Modellen bygger på en antagelse af, at interaktionerne mellem nedbrydningen af methan og de klorerede alifater kan beskrives ved kompetitiv inhibering. Gyldigheden af denne model vil blive belyst igennem laboratorieforsøg. Resultaterne er detaljeret beskrevet i Broholm et al. (1991).

### 3.4.1 En matematisk model for nedbrydningen af methan og TCE

Som tidligere nævnt kan omsætningen for methan beskrives med følgende Monod ligning, der er tilpasset et to-fase (vand/luft) batchsystem og som tager hensyn til kompetitiv inhibering:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_L}{(V_L + V_A F_A)} \times k_s \frac{S}{S + K_s (1 + \frac{c}{K_c})} \quad (3)$$

Faktoren  $V_L / (V_L + V_A F_A)$  tager hensyn til, at methan (og TCE) fordeles mellem luft- og væskefasen, men kun omsættes i væskefasen.

En tilsvarende ligning gælder for omsætningshastigheden for TCE:

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{V_L}{(V_L + V_A F_c)} X k_c \frac{C}{C + K_c (1 + \frac{S}{K_s})} \quad (4)$$

hvor C og S er koncentrationen af henholdsvis TCE og methan (mg/l), X er koncentrationen af biomasse (mg protein/l),  $k_s$  er den maksimale omsætningshastighed af methan (mg methan/mg protein/dag),  $k_c$  er den maksimale omsætningshastighed af TCE (mg TCE/mg protein/dag),  $K_s$  er halvmætningskonstanten for methan (mg/l),  $K_c$  er halvmætningskonstanten for TCE (mg/l),  $F_s$  og  $F_c$  er fordelingskoefficienten mellem luft og vand for methan og TCE,  $V_L$  og  $V_A$  er volumenet af henholdsvis væske- og luftfase i batchforsøget (1)

Divideres ligning 3 med ligning 1 fås en ligning, der beskriver en sammenhæng mellem koncentrationen af methan og koncentrationen af eksempelvis TCE, som er uafhængig af tiden og uafhængig af biomassen:

$$\frac{dC}{dS} = \frac{(V_L + V_A F_s)}{(V_L + V_A F_c)} \frac{k_c}{k_s} \frac{C}{S} \frac{(S + K_s (1 + \frac{C}{K_c}))}{(C + K_c (1 + \frac{S}{K_s}))} \quad (5)$$

Sættes  $K_s$  henholdsvis  $K_c$  udenfor parentes fås følgende simple differentialligning:

$$\frac{dC}{dS} = \frac{(V_L + V_A F_s)}{(V_L + V_A F_c)} \frac{k_c}{k_s} \frac{C}{S} \frac{K_s}{K_c} \quad (6)$$

Løsningen til denne differentialligning er:

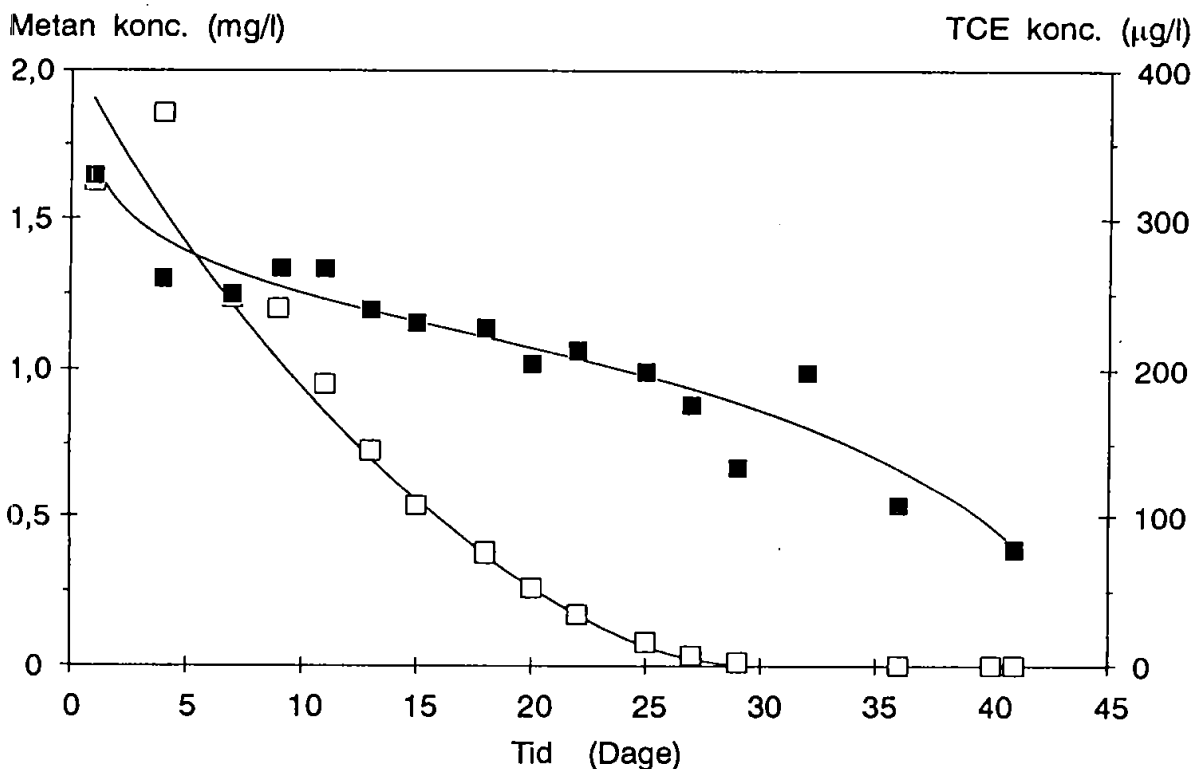
$$\frac{C}{C_0} = \frac{S}{S_0} \frac{(V_L + V_A F_s)}{(V_L + V_A F_c)} \frac{k_c}{k_s} \frac{K_s}{K_c} \quad (7)$$

hvor  $C_0$  og  $S_0$  er startkoncentrationen af henholdsvis TCE og methan. Af denne løsning fremgår det, at normeres koncentrationen af TCE og methan med startkoncentrationen af henholdsvis TCE og methan fås en sammenhæng, som er uafhængig af startkoncentrationerne.

### 3.4.2 Forsøgsopstilling

Forsøgene blev udført i 117 ml glas flasker med Miniert propper. Flaskerne indeholdt 10 ml næringssaltopløsning, der blev podet med bakteriekultur. Bakteriekulturen var en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier, der levede med methan som eneste kulstof- og energikilde. Kulturen var opformeret fra søsediment udtaget i Lyngby Sø.

TCE blev tilsat forsøgene i varierende startkoncentrationer mellem 50 og 4300  $\mu\text{g/l}$  og methan blev tilsat forsøget i varierende startkoncentrationer på 0,53 mg/l, 1,7 mg/l og 3,2 mg/l. Til forsøgene med 3,2 mg/l methan blev der undervejs tilsat ren ilt for at undgå iltmangel. Til kontrolflasker blev der tilsat 0,3 g natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )/l for at hindre biologisk aktivitet. Flaskerne blev inkuberet i mørke ved  $10^\circ\text{C}$  i en roterende kasse. Methan blev målt på luftprøver, der blev analyseret på en gaskromatograf udstyret med en Flamme Ioniserings Detektor (FID). TCE blev målt på luftprøver, der blev analyseret på en gaskromatograf udstyret med en Elektron Capture Detektor (ECD).

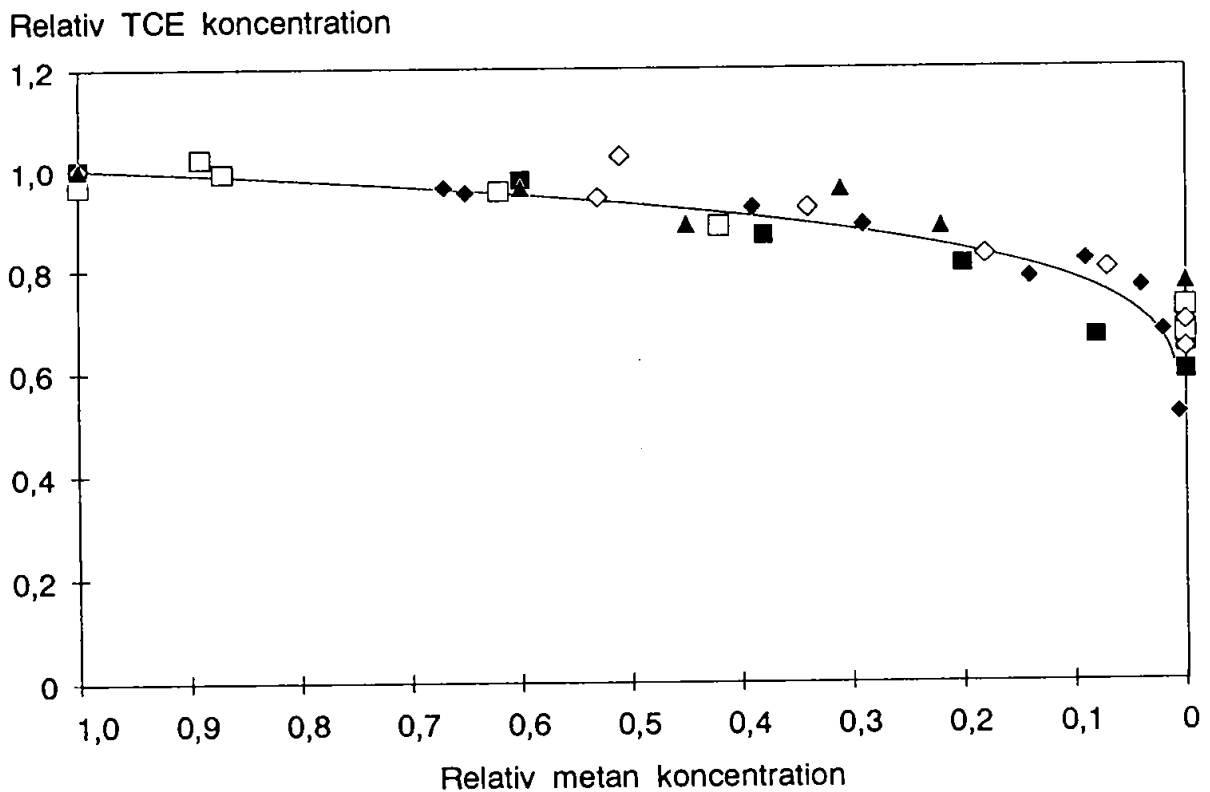


Figur 3.11: Koncentrationen af methan( $\square$ ) og TCE( $\blacksquare$ ) som funktion af tiden med en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier.



### 3.4.3 Resultater

Figur 3.11 viser den samtidige nedbrydning af TCE og methan for en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier for én kombination af startkoncentration af methan og TCE (1,7 mg methan/l og 300  $\mu\text{g}$  TCE/l). Den absolutte koncentration af henholdsvis methan og TCE er normeret med startkoncentrationerne. I figur 3.12 er vist den relative koncentration af TCE som funktion af den relative koncentration af methan for 5 kombinationer af startkoncentrationer af TCE og methan. Figuren viser, at disse 5 kombinationer følger en fælles kurve. Denne fælles kurve er simuleret med ligning (6). Den bedste simulering er også vist i figur 3.12. Korrelationskoefficienten  $r^2$  er 0,86, hvorimod den bedste rette linie kun har en  $r^2$  på 0,56. Dette viser, at sammenhængen mellem TCE og methan kan beskrives med en model, der tager hensyn til kompetitiv inhibering, og at mekanismen mellem nedbrydningen af TCE og methan sandsynligvis også er kompetitiv inhibering. Dette bevirker, som det ses i figur 3.12, at methan inhiberer omsætningen af TCE, og at TCE inhiberer omsætningen af methan (som det sås i afsnit 3.2 om toxicitet af TCE og 1,1,1 - TCA).



Figur 3.12: Den normerede koncentration af TCE som funktion af den normerede koncentration af methan i 5 forsøg med en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier. Forsøgene blev opstillet med følgende begyndelseskoncentrationer af henholdsvis methan (mg/l) og TCE ( $\mu\text{g}$ /l): 0,5;50 (■), 0,5;250 (◇), 0,5;-2300 (▲), 0,5;4300 (□), 1,8;260 (◆).

De 5 kombinationer af startkoncentrationer af methan og TCE er desværre alle med methankoncentrationer mindre end 1,7 mg/l. Forsøgene med de højeste startkoncentrationer af methan på 3,2 mg/l følger desværre ikke den fælles kurve. Dette skyldes sandsynligvis, at vækstforholdene ændres undervejs i forsøget. En forklaring på dette kan være, at ved de lave startkoncentrationer af methan er væksten ikke begrænset af kobber. I forsøget med høj startkoncentration af methan opnås nogle højere koncentrationer af biomasse, som følge af den større mængde methan. Når biomassen øges, kan væksten ændres fra ikke kobberbegrænset til kobberbegrænset, hvilket kan have en dramatisk indflydelse på nedbrydningen af TCE (se afsnit 3.1). Den opstillede model fungerer, hvis ikke vækstforholdene ændres undervejs i forsøget, idet modellen ikke tager hensyn til, at de kinetiske konstanter er variable.

#### 3.4.4 Konklusion

Forsøgene har vist, at nedbrydningen af TCE og methan kan beskrives ved en model, der tager hensyn til kompetitiv inhibering mellem TCE og methan. Om modellen er tilstrækkelig for alle klorerede alifater er uvist, men den gælder sandsynligvis ikke for 1,1,1-TCA (se afsnit 3.2). Modellen kræver et sæt af kinetiske konstanter, som desværre afhænger af vækstforholdene for de methan-oxiderende bakterier ( $\text{Cu}^{++}$ , næringssalte, temperatur).

Forsøgene viste, at nedbrydningen af TCE er mere effektiv ved lave methankoncentrationer end ved høje. Som en konsekvens af dette er nedbrydningen af TCE vist at være hurtigst, når der slet ikke er nogen methan tilstede (se afsnit 3.1). Bakterier kan imidlertid ikke forsætte med at omsætte TCE uden methan, idet denne omsætning kræver energi, som bakterierne får fra methan-oxidationen.

## 4. MIKROBIEL NEDBRYDNING AF KLOREREDE ALIFATER UNDER ANAEROBE FORHOLD.

Jens Aamand

Afdeling for Generel Mikrobiologi (AGM), Københavns Universitet.

I forbindelse med forureningen ved Skrydstrup specialdepot blev der igangsat et projekt, hvor det blev undersøgt, om mikrobiel nedbrydning af klorerede alifater under denitrificerende og methanogene forhold var mulig (Aamand, 1988). Formålet med dette projekt var at undersøge, hvorvidt tilsætning af et bakterielt let omsætteligt stof kunne fremme en mikrobiel nedbrydning af klorerede opløsningsmidler dels under methanogene og dels under denitrificerende forhold.

### 4.1 METODER

For at belyse muligheden for en mikrobiel nedbrydning af de klorerede alifater, der findes ved Skrydstrup specialdepot, blev der opstillet nedbrydningsforsøg dels med inoculum beriget fra methanogent slam (Lundtofte renseanlæg) dels med materiale beriget fra et anaerobt grundvandssediment (Mørkhøj Bygade) og dels med grundvand fra Skrydstrup specialdepot. Bakterierne blev dyrket ved henholdsvis 30 °C, 24 °C og 10 °C.

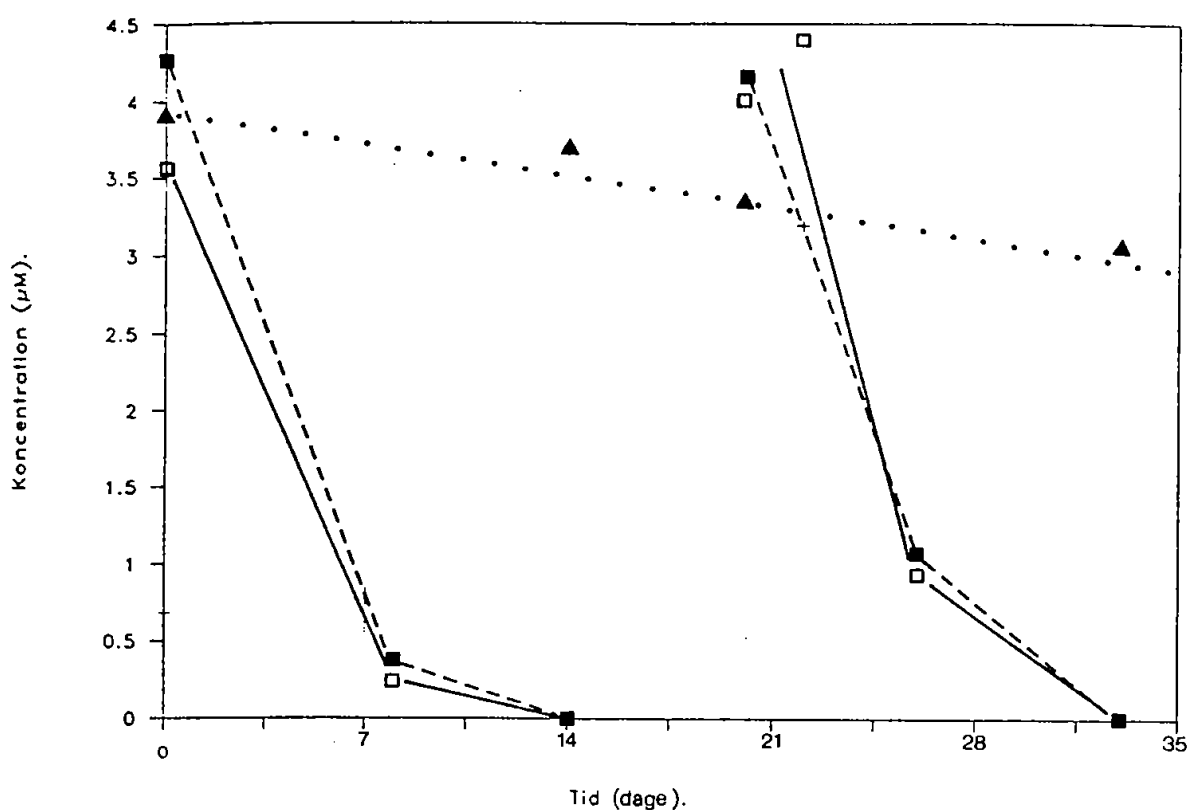
Med grundvandssedimentet fra Mørkhøj Bygade og med det anaerobe slam fra Lundtofte renseanlæg blev fremstillet berigelseskulturer i mineralmedium med et af de i tabel 4.1 listede primærsubstrater. Fra de mikrobielt aktive flasker overførtes et vist volumen til nyt mineral medium med samme primær substrat og et af følgende klorerede stoffer: Tetraklorethylen (PCE), triklorethylen (TCE) og 1.1.1.-triklorethan (TCA). Proceduren blev gentaget således, at der blev dannet 1. 2. og 3. generations kulturer. Ved at fremstille berigelseskulturer blev opnået en renere kultur af organismer, der specifikt var i stand til at nedbryde de substrater, som der blev beriget med. Da det medium, bakterierne overførtes til, samtidig havde et lavt indhold af sulfat og nitrat, havde sulfatreducerende og denitrificerende bakterier ikke nogen tilgængelige electronacceptorer, og det var derfor overvejende methanogene og forgærende bakterier, der voksede op.

Nedbrydningsforsøgene blev udført i 117 ml flasker med 50 ml anaerobt mineralmedium (Aamand, 1988). Flaskerne var forsynede med gastætte teflonbelagte propper, og en anaerob gasfase bestående af 20% CO<sub>2</sub> og 80% N<sub>2</sub>. For at kontrollere, at redoxpotentialet var konstant lavt gennem forsøgsperioden, tilsattes 0.5 mg/l resazurin, en redoxindikator med omslagsområde ved -80 mV. Alle flasker blev reduceret med Na<sub>2</sub>S. Kloreret stof blev tilsat til en startkoncentration på 300-600 µg/l. Forbrug af kloreret stof blev målt gaschromatografisk. Det var ikke muligt på Afdeling for Generel Mikrobiologi, at analysere for lavere klorerede alifater (diklorethylener og vinylklorid).

## 4.2 RESULTATER

### 4.2.1 Nedbrydning med grundvandssediment fra Skrydstrup specialdepot

Der blev ikke observeret nedbrydning af PCE, TCE eller TCA i forsøg, hvor grundvand fra Skrydstrup blev anvendt som inoculum. Redoxpotentialet i grundvandet ved Skrydstrup er højt. I den øverste del af magasinet findes opløst ilt, og dybere nede findes høje koncentrationer af både nitrat og sulfat (DGU, 1988). Sandsynligvis bevirker det høje redoxpotentiale, at strengt anaerobe organismer er undertrykt, så en anaerob nedbrydning af klorede alifater derfor ikke er mulig.

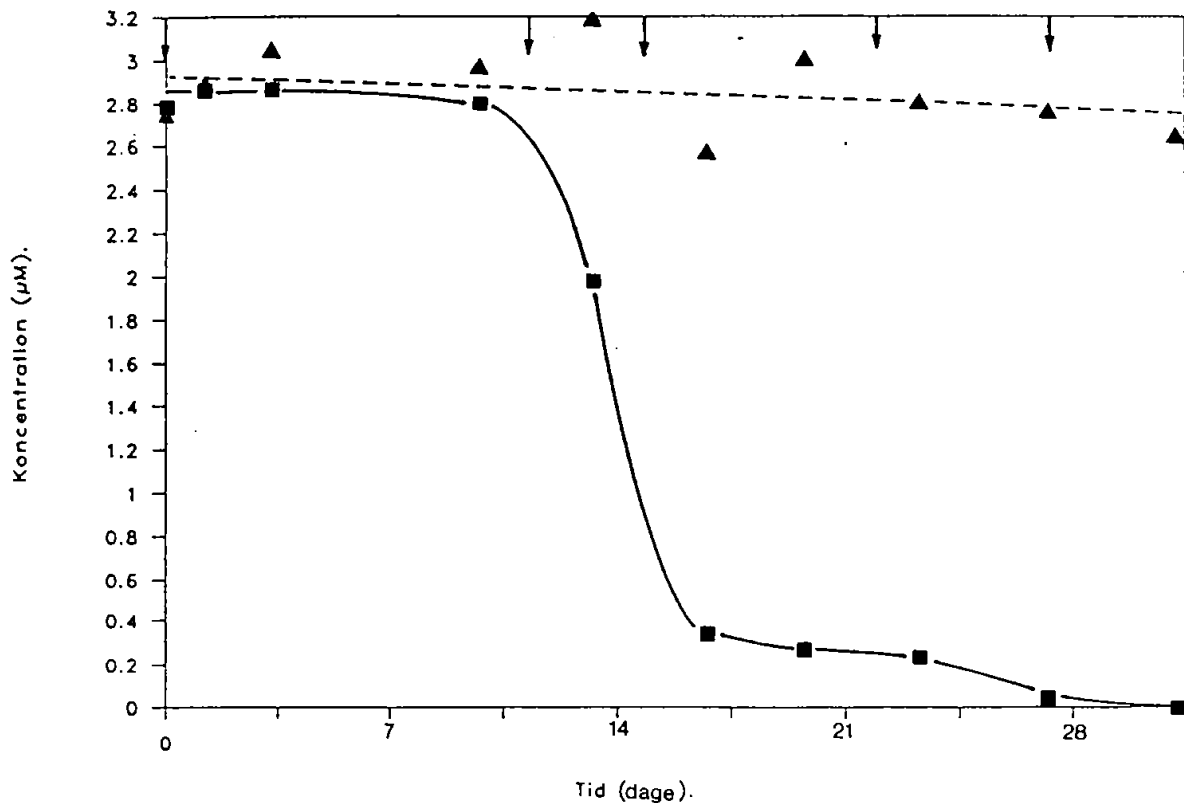


Figur 4.1: Reduktiv deklorering af 1,1,1-TCA i 117 ml flasker. Inoculeret med anaerobt slam og inkuberet ved 37 °C. Flasker tilsat 10 mM acetat som primærsubstrat (□), Flasker uden primærsubstrat (■), Kontrolflasker (▲). Resultaterne er gennemsnit af triplikate forsøg.

### 4.2.2 Nedbrydning med anaerobt slam fra renselanlæg

I forsøg med 10% anaerobt slam fra Lundtofte renselanlæg observeredes et meget hurtigt fald i koncentrationen af den tilsatte TCA. I løbet af 7 dage var ca. 85 % omsat. En gentagen tilsætning efter 20 dage fra forsøgets start medførte et tilsvarende hurtigt nedbrydningsforløb (figur 4.1). Til nogle flasker tilsattes acetat (10 mM) som primær kulstofkilde, uden at dette

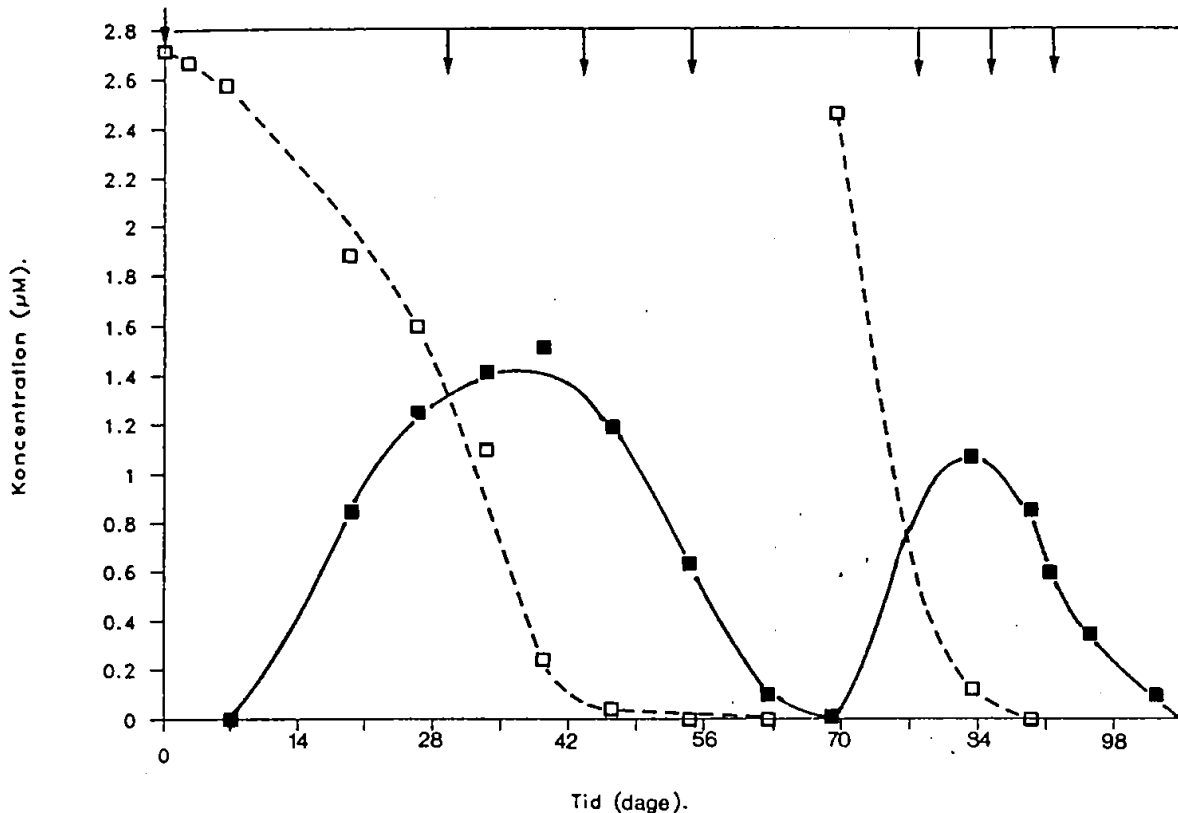
dog havde nogen effekt på nedbrydningsmønsteret. Tilsyneladende indeholdt slammet så meget organisk materiale, der kan fungere som primær kulstofkilde, at en yderligere tilsætning af acetat ikke havde nogen effekt. I parallelt kørende kontrolflasker indeholdende autoklaveret slam, observeredes kun et mindre fald i koncentrationen af TCE som følge af fordampning igennem propperne.



Figur 4.2: Reduktiv deklorering af TCE i 117 ml flasker. Berigelse fra anaerobt slam inkuberet ved 37 °C. Flasker tilsat acetat som primærsubstrat (■), Kontrolflasker (▲). Pilene angiver tidspunkter for tilsætning af acetat (10 mM). Resultaterne er gennemsnit af triplikate forsøg.

3. generationskulturer fra samme renselanlæg havde desuden potentiale for reductiv deklorering af TCE og PCE. I figur 4.2 ses nedbrydningsforløbet af TCE. Efter en lag periode på ca. 20 dage begyndte den reductive deklorering, og efter ca. 33 dage var ca. 90 % af begyndelseskoncentrationen af TCE forsvundet. Herefter forløb processen noget langsommere, og først efter 42 dage var al TCE omdannet. I dette forsøg var det oprindelige organiske materiale elimineret igennem fortynding og nedbrydning, og det var derfor nødvendigt at tilsætte en primær kulstofkilde (acetat) for at få den reductive deklorering til at forløbe. Således var det nødvendigt at tilsætte acetat fem gange for at opnå fuldstændig nedbrydning af 2.8 µM TCE.

I figur 4.3 ses forløbet af den mikrobielle omdannelse af PCE. Dekloreringen forløb uden forudgående lagfase, og efter ca. 40 dage var ca. 90% omdannet. Herefter faldt omdannelseshastigheden, og først efter ca. 56 dage var al PCE forsvundet. Nedbrydningen af PCE

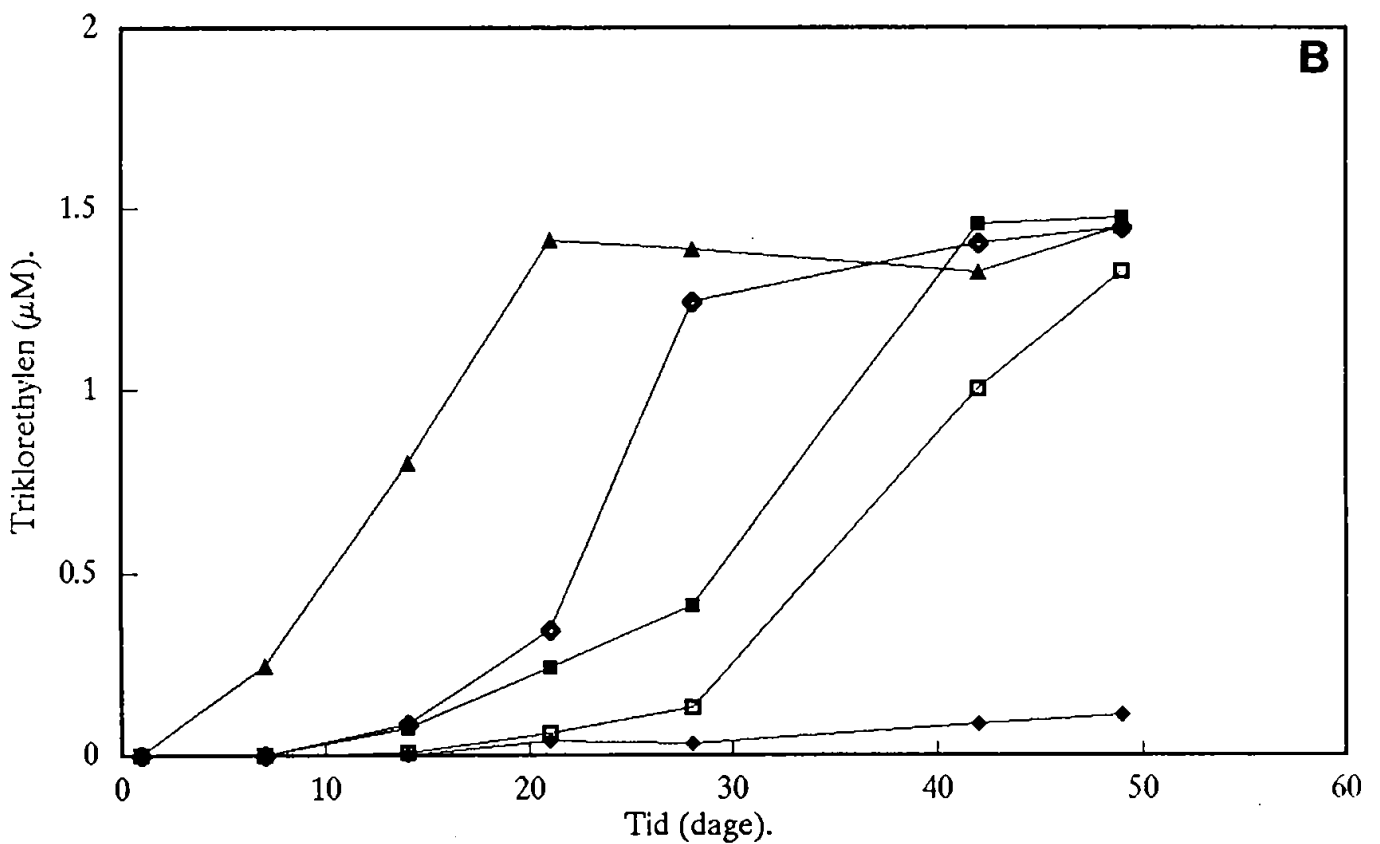
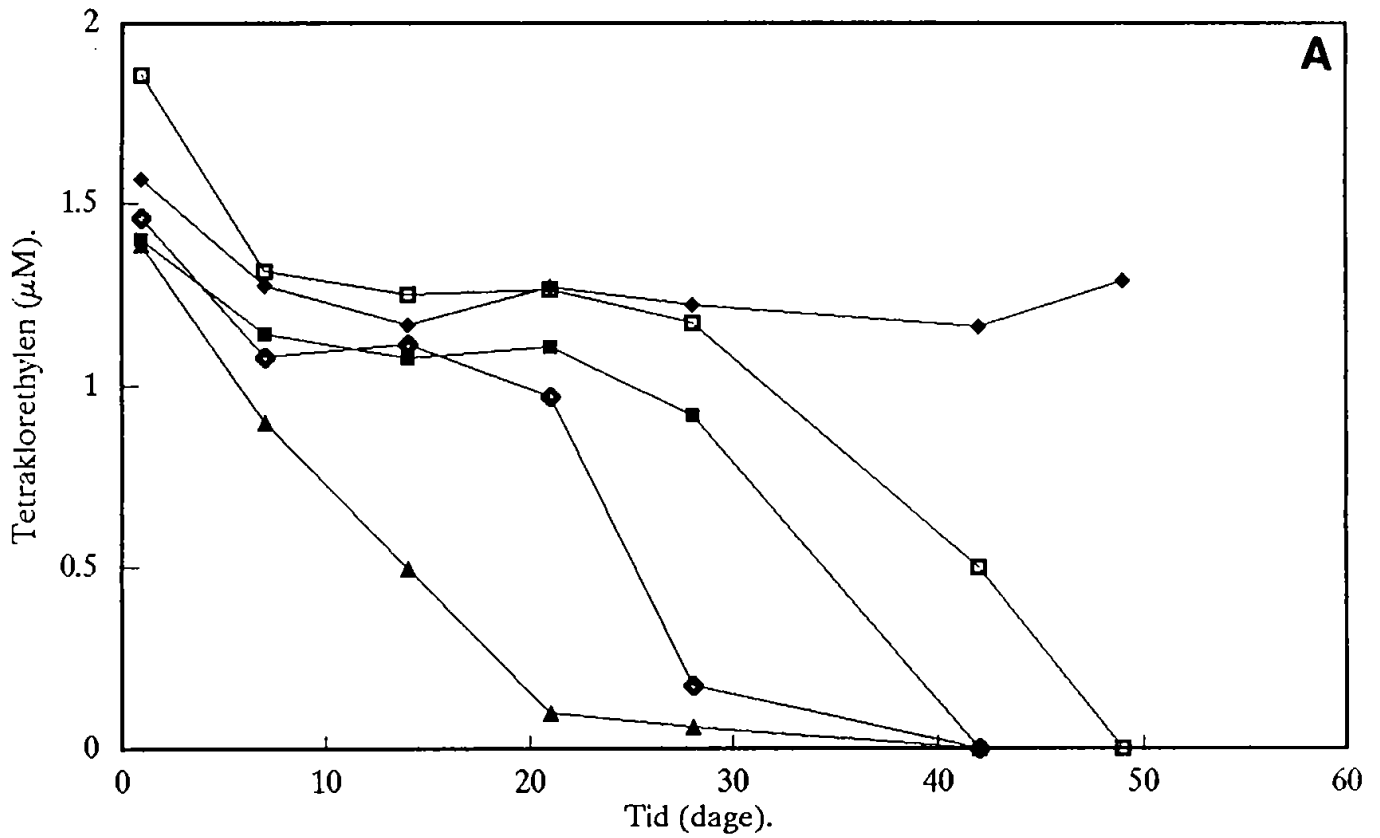


Figur 4.3: Reduktiv deklorering af PCE (□) og samtidig dannelse af TCE (■) i 117 ml flasker med acetat som primærsubstrat. Berigelse fra anaerobt slam inkuberet ved 37 °C. Pilene angiver tidspunkter for tilsætning af acetat (10 mM). Resultaterne er gennemsnit af triplikate forsøg.

blev ledsaget af accumulering af TCE, der også omdannedes. Efter at al TCE var omdannet, tilsattes PCE igen til en koncentration på 2.5 µM. Nedbrydningsforløbet gentog sig, dog foregik den reductive deklorering af PCE og den samtidige dannelse af TCE meget hurtigere. I løbet af hver nedbrydningscyclus var det nødvendigt at tilsætte acetat 4 gange svarende til en akkumuleret tilsætning på 40 mM (ca. 2.5 g/l). Det store acetatforbrug kan skyldes, at der i kulturen findes acetatnedbrydende bakterier, der ikke kan foretage den reductive deklorering. Disse bakterier vil herved konkurrere med de deklorerende organismer om det tilgængelige acetat. Senere udførte forsøg med bakterier fra grundvands sedimentet ved Mørkhøj bygade har vist, at acetat er en dårlig kulstofkilde til understøttelse af reductiv deklorering af PCE (se nedenfor).

I kontrolflasker (autoklaveret) og i flasker uden primærsubstrat observeredes en mindre fjernelse af PCE på 2,3% /uge som følge af fordampning (Aamand 1988).

Anaerobt slam fra fem forskellige renselanlæg blev sammenlignet med hensyn til deres potentiale for reductiv deklorering af tetraklorethylen (figur 4.4) (Aamand et al., 1990). Med slam fra Avedøre renselanlæg som inoculum var næsten al den tilsatte PCE omsat indenfor 20 dage uden en forudgående lag periode. Faldende dekloreringsaktivitet blev observeret i



Figur 4.4: (A): Reduktiv deklorerung af PCE og (B): accumulering af TCE i 117 ml flasker inkuberet ved 37 °C og inoculeret med anaerobt slam fra fem renselanlæg. Avedøre ( $\blacktriangle$ ), Sjælsø ( $\blacklozenge$ ), Vedbæk ( $\blacksquare$ ), Nivå ( $\square$ ) og Kirkeskov ( $\blacklozenge$ ). Resultaterne er gennemsnit af triplikate forsøg.

slam fra Sjælsø, Vedbæk og Nivå renseanlæg. Reduktiv deklorering af PCE medførte accumulering af triklorethylen, der ikke blev yderligere dekloreret (fig 4.4B). Slam fra Kirkeskov renseanlæg viste intet potentiale for reductiv deklorering af PCE i den undersøgte periode. Lignende forskelle imellem forskellige renseanlæg blev observeret af Fathepure og Boyd (1988). I deres undersøgelser blev reductiv deklorering af PCE observeret med materiale fra to ud af fire anaerobe behandlingsanlæg i en forsøgsperiode på 3 uger. Avedøre renseanlæg modtager den største mængde af industrispildevand, men der er ikke nogen umiddelbar sammenhæng imellem industriel belastning og deklorering, idet også Kirkeskov renseanlæg modtager en del industrispildevand.

Tabel 4.1 Mikrobiel omdannelse af tetrachlorethylen (PCE) til trichlorethylen (TCE) i flasker med grundvandssediment fra Mørkhøj bygade som inoculum. Analyseret efter 78 dages inkubation. Den initiale PCE koncentration var 300 µg/l.

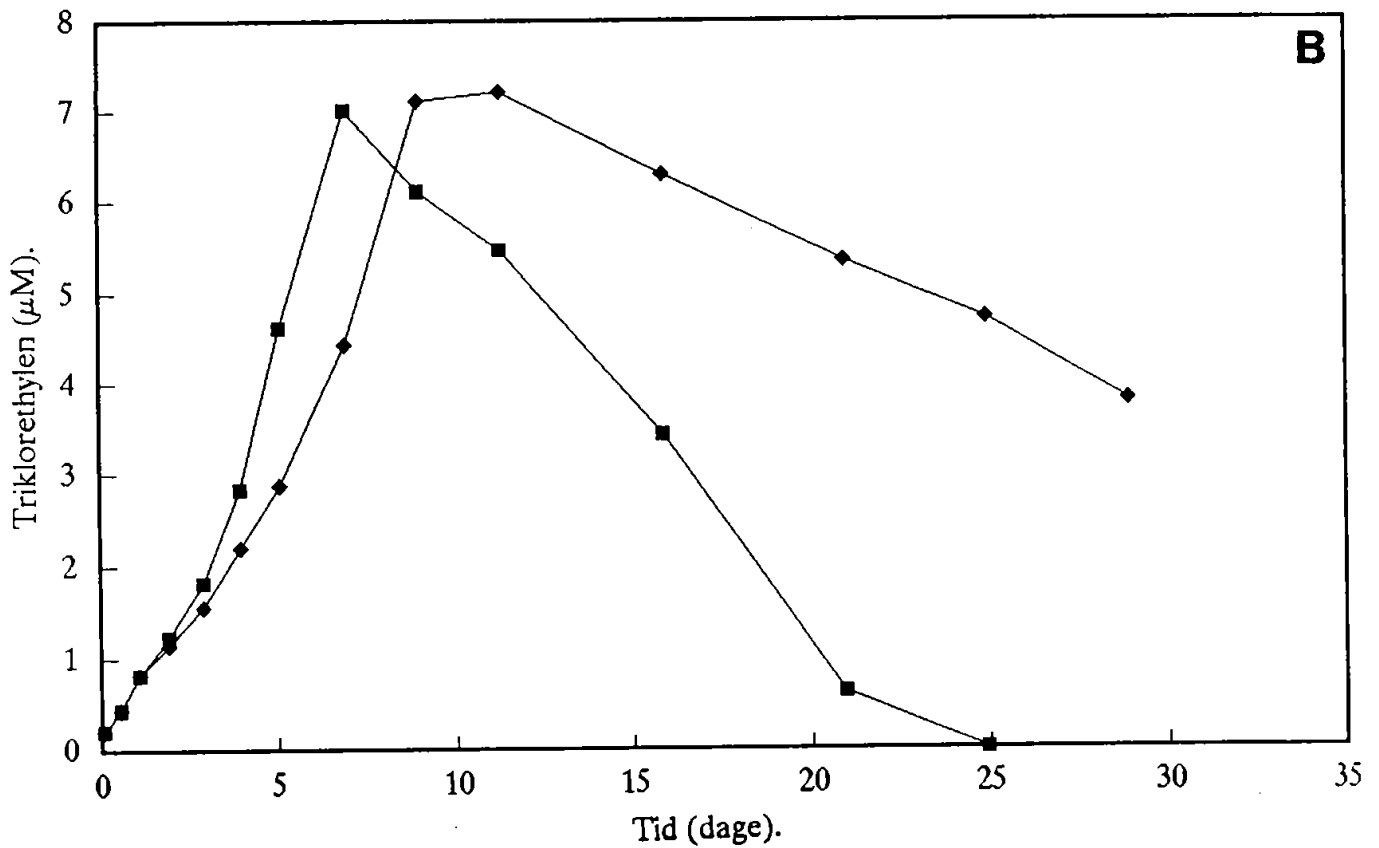
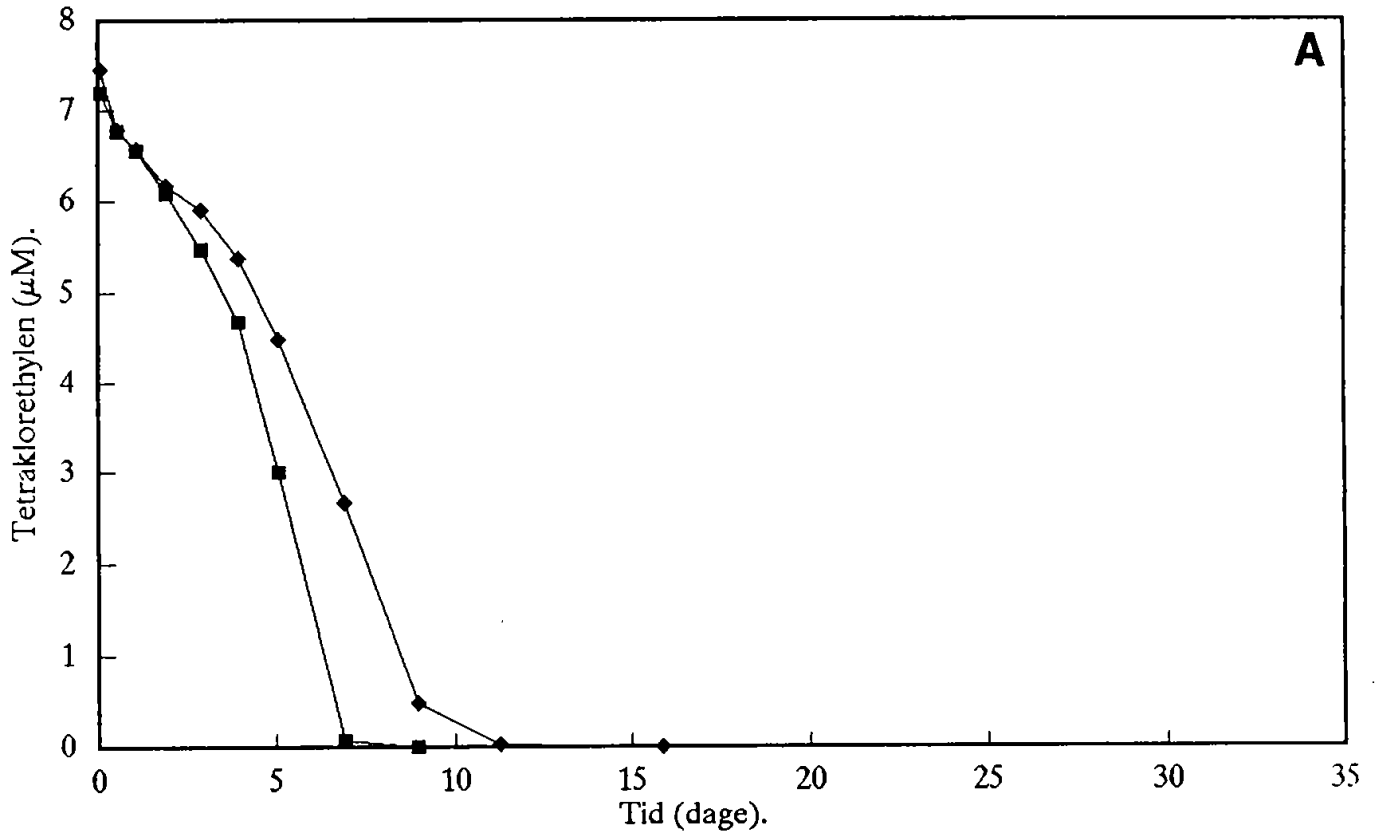
| Primærsubstrat <sup>1</sup> | PCE<br>µg/l | TCE<br>µg/l |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| Butyrat                     | 0           | 0           |
| Laktat                      | 0           | 0           |
| Glucose                     | 0           | 0           |
| Ethanol                     | 0           | 0           |
| Format                      | 0           | 0           |
| Succinat                    | 0           | 0           |
| Pyruvat                     | 0           | 67          |
| Gærekstrakt                 | 0           | 77          |
| Isobutyrat                  | 0           | 94          |
| 1-Propanol                  | 36          | 151         |
| Acetat                      | 222         | 23          |
| Methanol                    | 188         | 5           |
| Trimethylamin               | 233         | 4           |
| Uden primærsubstrat         | 199         | 0           |
| Kontrol                     | 194         | 0           |

<sup>1</sup> Koncentrationer: Format 10 mM, Gærekstrakt 1 g/l, de øvrige stoffer 20 mM.

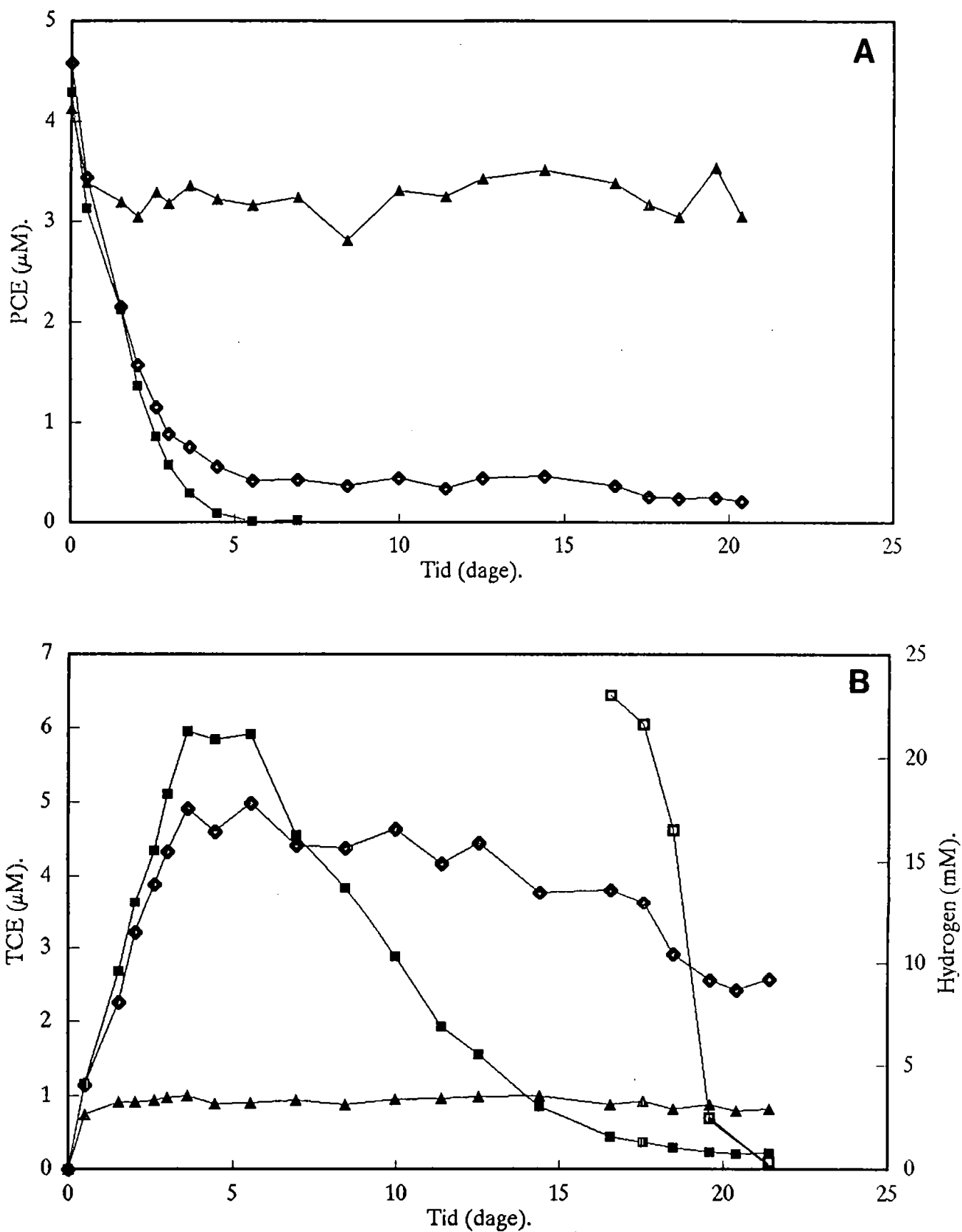
#### 4.2.3 Nedbrydning med grundvandssediment fra Mørkhøj bygade

Forskellige primærsubstraters potentiale for understøttelse af reductiv deklorering af PCE blev undersøgt i et forsøg, hvor et forurenede grundvandssediment blev anvendt som inoculum (Industrigrund ved Mørkhøj bygade). Det ses, (tabel 4.1) at substraterne butyrat, laktat, glucose, ethanol, format og succinat er mest velegnede som primærsubstrater til understøttelse af reductiv deklorering af PCE. Både den tilsatte PCE og den herfra dannede TCE var fuldstændig omdannet efter 78 dages inkubering. Pyruvat, gærekstrakt, isobutyrat og 1-





Figur 4.5: (A): Reduktiv deklorering af PCE og (B): accumulering af TCE i 117 ml flasker. Berigelse fra grundvandssediment inkuberet ved 24 °C. Flasker tilsat 20 mM hydrogen (■), Flasker uden hydrogen (◆).



Figur 4.6: (A): Reduktiv deklorering af PCE og (B): accumulation af TCE i 117 ml flasker. Berigelse fra grundvands sediment inkuberet ved 24 °C. Flasker uden tilsætninger (■), Flasker tilsat 11 mM sulfat (◇), flasker tilsat 12 mM nitrat (▲). På dag 17 tilsættes 23 mM hydrogen (□) til flaskerne med sulfat.

propanol kunne understøtte reduktiv deklorering, men efter 78 dage var der stadig noget triklorethylen tilbage. Acetat, methanol og trimethylamin var ikke i væsentlig grad i stand til at understøtte reduktiv deklorering af PCE.

Fælles for de primærsubstrater, der understøtter deklorering er, at der ved den anaerobe forgæring af disse dannes hydrogen. Hydrogen kan udnyttes som energikilde for visse methanogene-, sulfatreducerende-, og forgærende bakterier. Da hydrogen samtidigt indgår som reaktant i den reductive deklorering af PCE, opstilledes et forsøg til undersøgelse af, om hydrogen havde en stimulerende virkning på den reductive deklorering. I figur 4.5 ses, at hydrogen stimulerer den anaerobe omdannelse af både PCE og TCE. Størst er effekten ved nedbrydningen af den dannede TCE, der kun langsomt omdannes, når hydrogen ikke er tilstede. Begge serier af flasker var tilsat 2% vomsaft, som var tappet fra en ko (Kgl. Veterinær og Landbohøjskole), da tidligere forsøg har vist, at opretholdelse af dekloreringsaktivitet i gennem længere tid kræver tilstedeværelse af enten vomsaft eller gærekstrakt. Disse substrater indeholder formentlig også kulstofkilder, der kan give ophav til hydrogen og understøtte den reductive deklorering.

Da grundvandsmagasinet ved Skrydstrup specialdepot indeholder nitrat og sulfat, blev det undersøgt, om disse næringssalte indvirkede på den reductive deklorering af PCE. I løbet af fem dage var al den tilsatte PCE omsat til TCE i de flasker, hvor der hverken var tilsat nitrat eller sulfat (figur 4.6). Når sulfat var tilstede (11 mM) indtrådte en hæmning af dekloreringsprocessen af PCE efter tre dages inkubering. Efter dette tidspunkt gik nedbrydningen langsommere for tilsidst at ophøre. Nedbrydningsforløbet blev afspejlet i en accumulering af TCE, der heller ikke blev omsat videre (figur 4.6b). Årsagen til denne hæmning kan være, at en række sulfatreducerende bakterier er i stand til at udnytte  $H_2$  som energikilde og derved konkurrere med de deklorerende bakterier, om den hydrogen der kontinuert produceres ved nedbrydningen af den tilsatte vomsaft. For at undersøge dette nærmere tilsattes ved dag sytten 20 mM hydrogen til gasfasen i flaskerne, hvorefter hydrogen ikke længere var begrænsende. Umiddelbart efter hydrogentilsætningen genetableredes dekloreringsprocessen af TCE. Denne ophørte dog igen, så snart den tilsatte hydrogen var omsat (figur 4.6b).

Tilstedeværelse af nitrat (12 mM) medførte en voldsom hæmning af dekloreringsprocessen (figur 4.6). Initieelt sås en mindre accumulering af TCE, der dog ophørte efter få timer. Dette afspejler sandsynligvis, at der med inoculum overførtes aktive enzymer. De deklorerende bakterier er imidlertid ikke i stand til at vokse i dette miljø, hvorved dekloreringsprocessen ophører. Nitrat er vist at hæmme en række forskellige grupper af strengt anaerobe bakterier.

### 4.3 KONKLUSION

En række miljøer har potentiale for reduktiv deklorering af klorerede alifater. Processen kan kun forløbe ved en samtidig omsætning af en primær kulstofkilde (cometabolisk nedbrydning). En række substrater kan understøtte reduktiv deklorering, men stoffer, hvis omsætning medfører dannelse af hydrogen, er sandsynligvis mest velegnede. Hydrogen er en nødvendig

reaktant ved reduktiv deklorering og har som sådan en stimulerende virkning på omdannelsen af PCE og TCE.

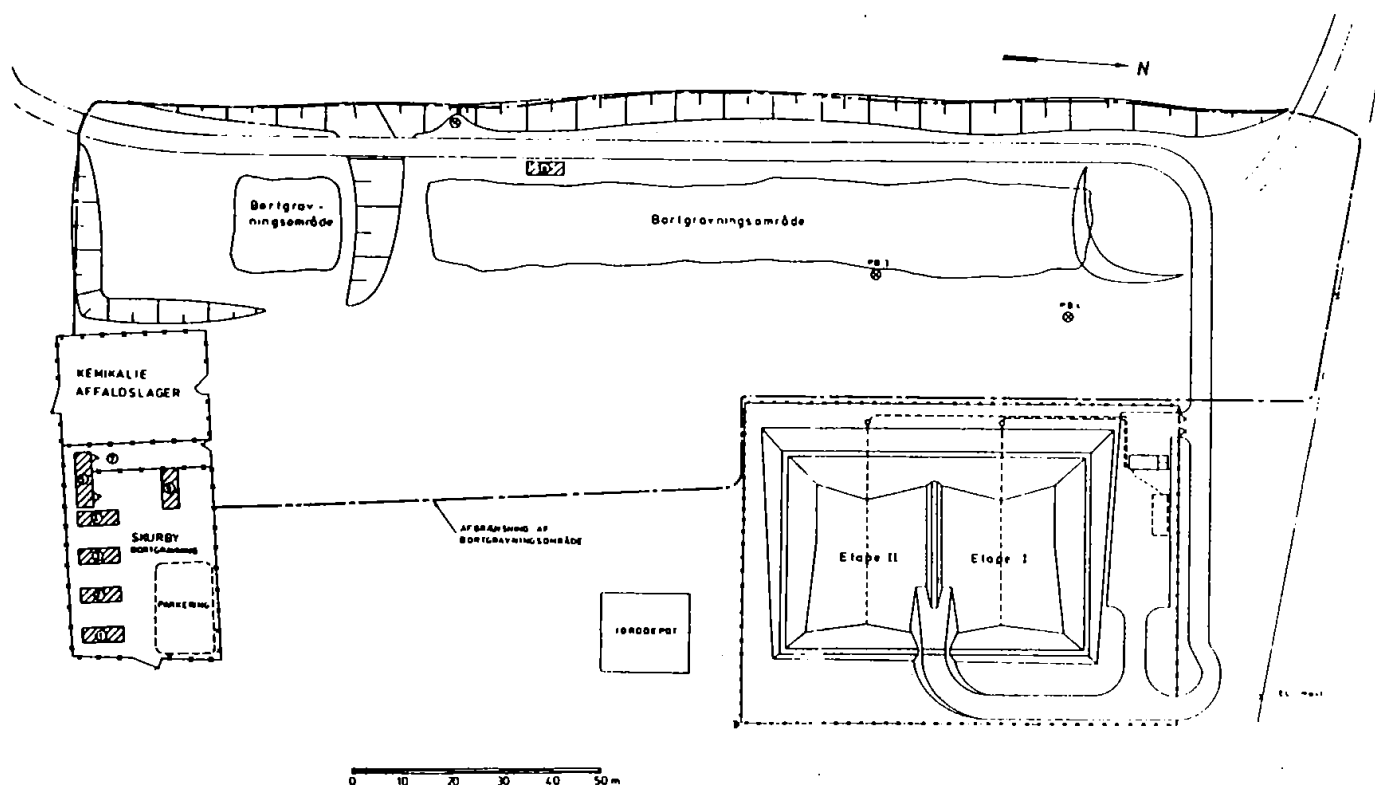
Mikroorganismene foretrækker de alifater med flest klorsubstituentter, og der ophobes midlertidigt lavere klorerede forbindelser. Dette kan være et problem, da for eksempel vinylklorid med kun et klor er det mest toksiske af de klorerede alifater.

Tilstedeværelse af nitrat medførte en næsten fuldstændig hæmning af den reduktive deklorering af PCE. En mindre hæmning blev observeret ved tilstedeværelse af sulfat. I grundvandet ved Skrydstrup findes både nitrat og sulfat, og det er sandsynligt, at den manglende nedbrydning i forsøg med grundvand som inoculum skyldes, at andre bakteriegrupper end de deklorerende er favoriseret i dette miljø.

## 5. BIOLOGISK NEDBRYDNING I MIDLERTIDIGT DEPOT: SKRYDSTRUP OPSAMLINGSDEPOT.

Bente A. Nyeland, Danmarks Miljøundersøgelser (DMU).

I forbindelse med afværgeforanstaltningerne ved Skrydstrup Specialdepot blev der i 1986 anlagt et opsamlingsdepot, hvori en del af den forurene jord og slagter blev deponeret. Depotet blev etableret med et anaerobt afsnit (etape 1) og et aerobt afsnit (etape 2). Opsamlingsdepotet blev betragtet som midlertidigt, og indtil andre muligheder for rensning og deponering af den forurenede jord kunne tages i anvendelse, blev tiden brugt til at gennemføre flere forskningsprojekter, hvoraf det ene var forsøg med biologisk nedbrydning af forureningsprodukterne i opsamlingsdepotet.



Figur 5.1: Plan over Skrydstrup opsamlingsdepot med angivelse af placeringen af etape 1 og etape 2.

### 5.1. ETABLERING AF DEPOTERNE.

Der blev deponeret ca 3000 m<sup>3</sup> jord i det anaerobe afsnit og ca 500 m<sup>3</sup> jord i det aerobe afsnit. (Sønderjyllands Amtskommune, 1987b). Den forurenede jord blev placeret på en HDPE bundmembran (high density polyethylene membrane). Desuden blev det anaerobe afsnit dækket med en LDPE-topmembran (low density polyethylene membrane) til sikring af anaerobe forhold (Fig 5.1).

Etaperne fik tilført slam fra renseanlæg således, at en anaerob og aerob biologisk aktivitet kunne sikres. For begge etaper etableredes særskilte perkolat opsamlings- og recirkuleringssystemer.

Perkolatet fra etaperne blev opsamlet i separate perkolatbrønde. I det anaerobe depot er perkolatet siden 1987 blevet recirkuleret 100% uden kontakt med ydre omgivelser. Perkolatet fra det aerobe depot recirkuleredes delvist, mens overskydende perkolat opsamledes i en nedgravet perkolattank, som var i kontakt med ydre omgivelser. Afhængigt af lokale nedbørsforhold og fordampning fra depotet blev perkolattanken tømt med jævne mellemrum.

Fra december 1986 blev forekomsten af de klorerede opløsningsmidler og deres nedbrydningsprodukter fulgt ved adskillige prøveudtagninger og analyser. Fra 1987 foreligger flere prøveudtagninger (11), mens der i de seneste år blev udtaget prøver 3-4 gange årligt. Samtlige perkolatprøver blev analyseret for en række uorganiske samleparametre, for kloralkylphosphater samt for de i tabel 5.1 anførte klorerede opløsningsmidler.

Tabel 5.1. Analyserede klorerede alifater ved de to midlertidige depoter (etape 1 og 2).

| Methaner        | Ethaner                        | Ethener                               |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| diklormethan    | klorethan*                     | vinylklorid*                          |
| triklormethan   | 1,1-diklorethan*(1,1-DCA)      | 1,1-diklorethen*(1,1-DCE)             |
| tetraklormethan | 1,1,1-triklorethan (1,1,1-TCA) | cis-1,2-diklorethen*(cis1,2-DCE)      |
|                 |                                | trans-1,2-diklorethen*(trans-1,2-DCE) |
|                 |                                | triklorethen (TCE)                    |
|                 |                                | tetraklorethen (PCE)                  |

De med \*-mærkede forbindelser kan alle forekomme som nedbrydningsprodukter af de klorerede alifater: 1,1,1-TCA, TCE og PCE.

Analysemetoderne udførtes som headspace gaskromatografi med electroncapture detektor (Nyeland, 1989 ) samt for vinylklorid ved gaskromatografi med massespektrometer som detektor.

Foruden den analytisk kemiske monitoring blev der i 1990 udført en mikrobiologisk undersøgelse af begge depoter, idet det har været af interesse at få bestemt den mikrobielle aktivitet i den kemikalieforurenet jord.

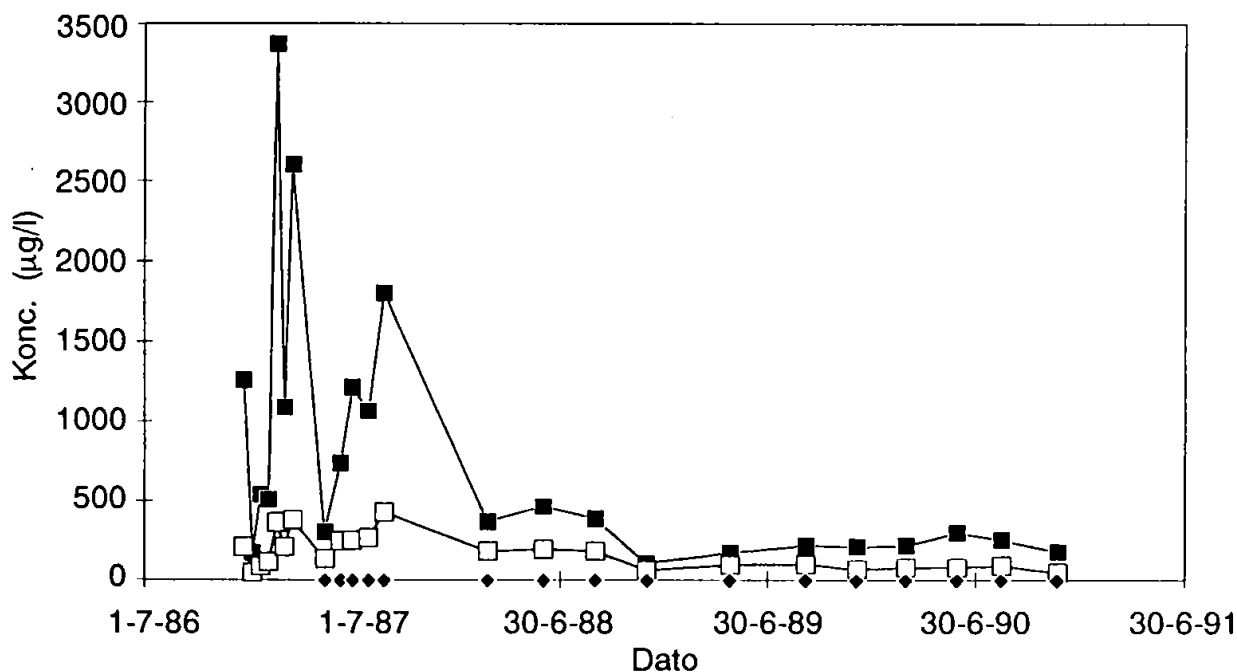
Der blev udtaget jordprøver fra de to depoter i forskellige dybder. Bakteriernes antal blev bestemt ved direkte tælling. Vækstraten blev bestemt ved inkorporering med tritieret thymidin i bakterielt DNA under anaerobe og aerobe laboratorieforhold. Desuden blev bakteriernes evne til at omdanne PCE og TCE under rette anaerobe og aerobe forhold i laboratoriet undersøgt (Aamand og Winding, 1991).

## 5.2. ANAEROBT DEPOT ( ETAPE 1).

I det anaerobe depot forefandt ved depotets etablering skønsmæssigt og totalt: 109 kg 1,1,1-TCA, 31 kg TCE og 0,6 kg PCE (Sønderjyllands Amtskommune, 1987b).

Der blev udtaget perkolatprøver til analyse første gang den 22. december 1986, mens det seneste sæt resultater er fra den 20. november 1990.

Figur 5.2 illustrerer sammenhæng mellem dato for udtagne perkolatprøver og den målte koncentration af forureningskomponenter i prøverne.



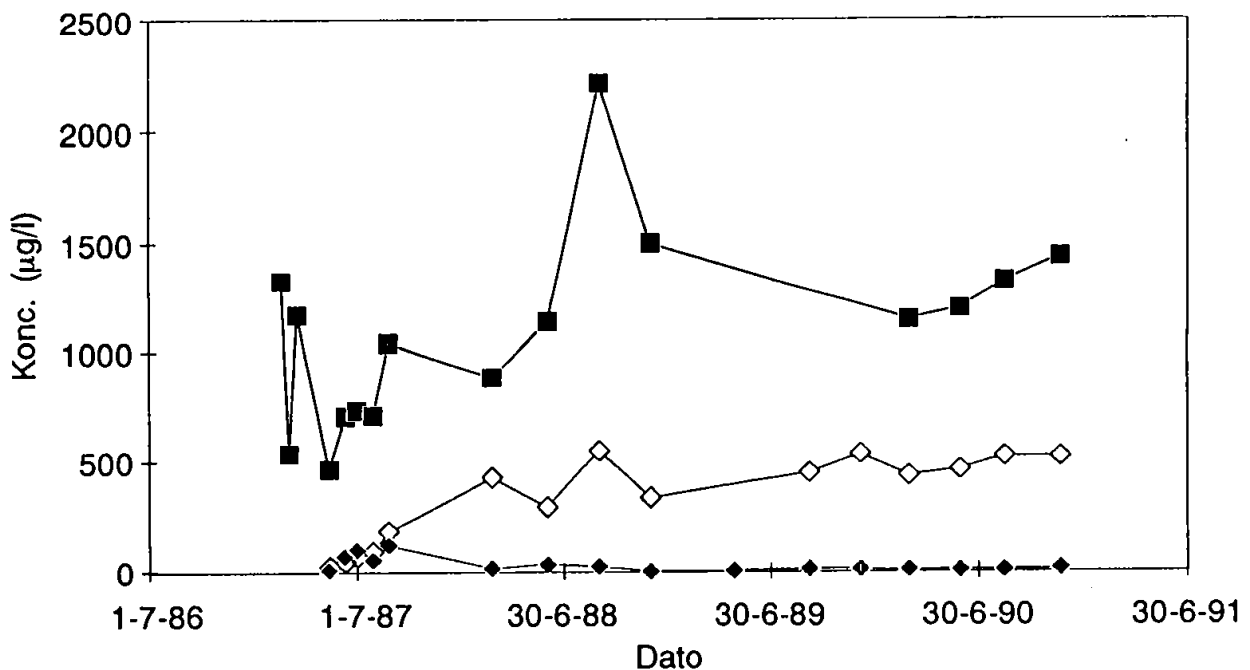
Figur 5.2: Tidsafhængig beskrivelse af forureningskomponenternes forekomst i etape 1 (anaerobt depot). 1,1,1-TCA(■), TCE(□) og PCE(♦).

I en vurdering af koncentrationsforholdene for forureningskomponenterne i det anaerobe depot må der tages hensyn til depotets tillukkede anaerobe tilstand samt til perkolatets recirkulering.

Hvis det antages, at perkolatet recirkuleres 100% anaerobt, kan de meget små koncentrationer af forureningskomponenterne først i monitoringsfasen (fig 5.2) muligvis forklares ved, at systemet endnu ikke har opnået en form for ligevægt med hensyn til fordeling af komponenterne mellem depotets faste materialer og perkolatfasen. Senere på året (1987) ses en kraftig stigning i koncentrationen af især 1,1,1-TCA og TCE, som efterfølges af et fald, der for 1,1,1-TCA udgør ca 90% af højeste værdi i 1987, mens det for TCE er på ca 80% af højeste værdi i 1987. Koncentrationen af begge komponenter har de seneste par år været af en størrelse på omkring 50-250  $\mu\text{g/l}$ .

Med hensyn til PCE har koncentrationen af denne været lav og af vekslende størrelse gennem monitoringsperioden.

Figur 5.3 viser sammenhæng mellem dato for udtagne perkolatprøver og den målte koncentration af formodede nedbrydningsprodukter. På et tidligt tidspunkt i monitoringsfasen ses høje 1,1-DCA koncentrationer; dette niveau kan i store træk genfindes i hele perioden. Nogle måneder senere samme år (1987) påvises både 1,1-DCE og cis-1,2-DCE. Koncentrationen af sidstnævnte komponent er stigende med tiden. På to tidspunkter i 1988 er der påvist vinylklorid, dog i koncentrationer nær detektionsgrænsen (1  $\mu\text{g/l}$ ).



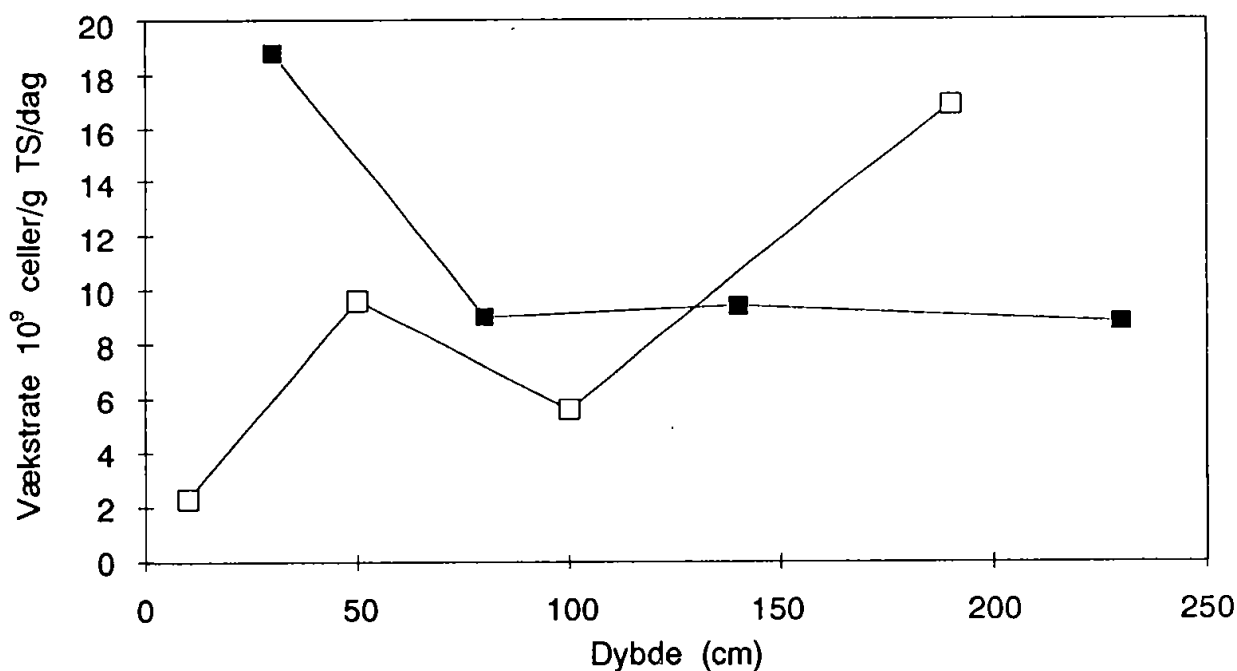
Figur 5.3: Tidsafhængig beskrivelse af formodede nedbrydningsprodukters forekomst i etape 1 (anaerobt depot). 1,1-DCA(■), cis 1,2-DCE(◇) og 1,1-DCE(◆)



Ved at sammenholde faldet i koncentrationen af forureningskomponenterne 1,1,1-TCA, TCE og PCE med dannelsen af de formodede nedbrydningsprodukter 1,1-DCA, 1,1-DCE, cis-1,2-DCE samt vinylklorid er der grund til at antage, at der i det anaerobe depot foregår en mikrobiel anaerob omsætning af de klorerede alifater.

Resultatet af den mikrobielle undersøgelse af det anaerobe depot (Aamand og Winding, 1991) viser, at der i dette depot er en relativ stor og aktiv bakteriepopulation, især i stor dybde (190 cm under membranoverfladen) (se Fig 5.4). Ved laboratorieforsøg blev det påvist, at mikroorganismene var i stand til at omsætte PCE under anaerobe forhold. Omdannelseshastigheden var dog afhængig af omgivende forhold som tilstedeværelse af primær substrater og essentielle næringssalte.

Der er således god overensstemmelse mellem fundet af nedbrydningsprodukter og tilstedeværelse af anaerob bakterieaktivitet i det anaerobe depot.



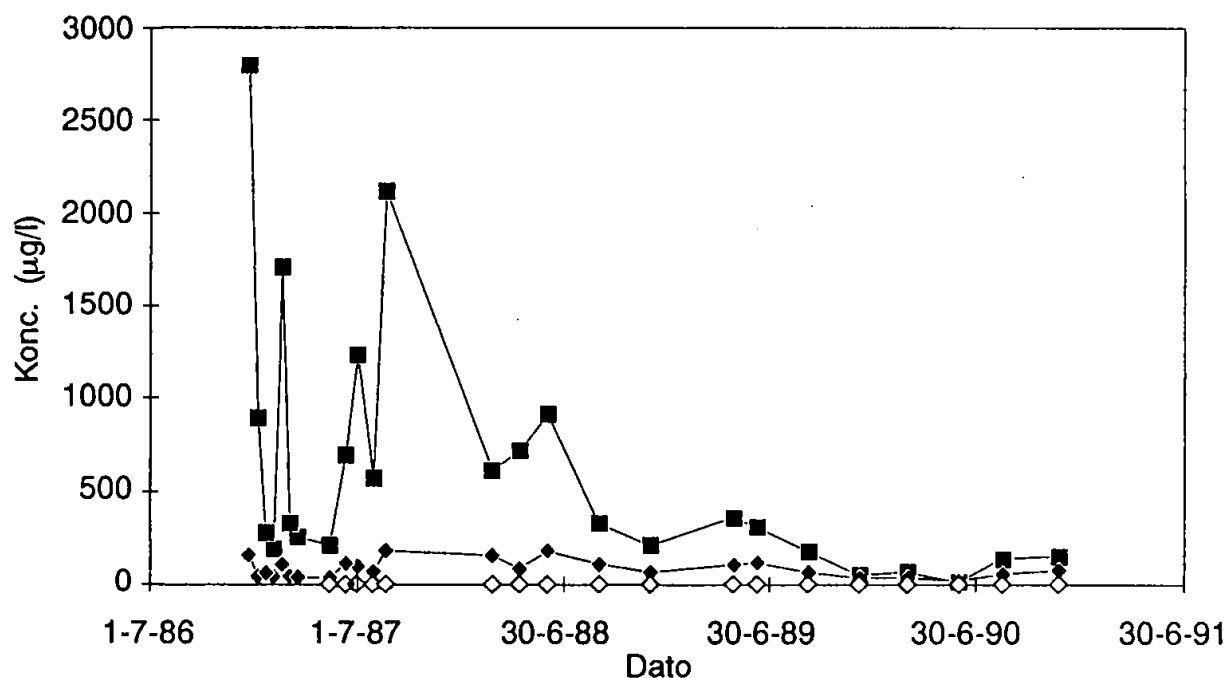
Figur 5.4: Mikrobiel aktivitet bestemt som inkorporering af radioaktivt mærket thymidin og omregnet til celler produceret/g jord tørstof(TS)/dag. Etape 1 (anaerobt depot)(□) og etape 2 (aerobt depot)(■).

### 5.3 AEROBT DEPOT (ETAPE 2).

I det aerobe depot blev det vurderet, at depotet ved etableringen totalt indeholdt: 0,2 kg 1,1,1-TCA, 0,1 kg TCE og <0,01 kg PCE. (Sønderjyllands Amtskommune, 1987a). Efterfølgende er der opstået nogen tvivl om disse koncentrationsangivelser, idet senere koncentrationsbestemmelser tyder på, at udgangskoncentrationerne muligvis har været højere

(Strøbæk 1989). Som tidligere nævnt er dette depot udækket og derfor udsat for udvaskning fra nedbør og for en vis fordampning fra de øverste jordlag.

Figur 5.5 viser sammenhæng mellem dato for udtagne perkolatprøver og de målte koncentrationer af forureningskomponenter i perkolatet.

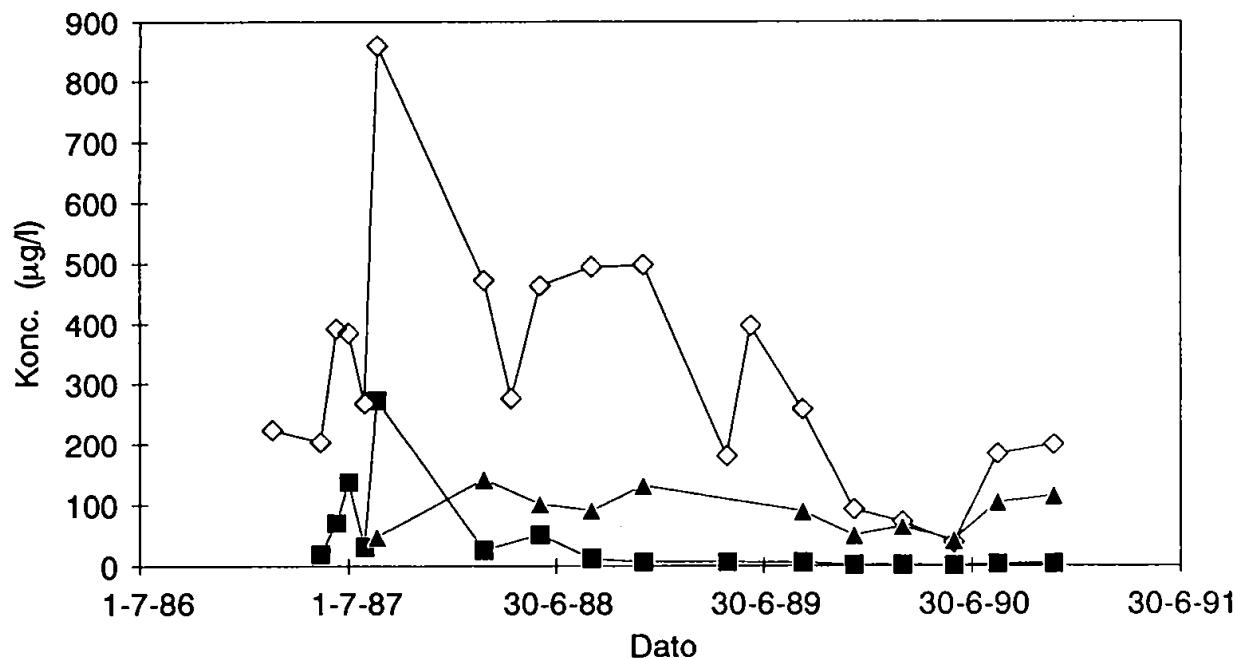


Figur 5.5: Tidsafhængig beskrivelse af forureningskomponenternes forekomst i etape 2 (aerobt depot). 1,1,1-TCA(■), TCE(♦) og PCE(◇).

Som nævnt recirkuleres perkolatet i det aerobe depot via en perkolatopsamlingstank i kontakt med den omgivende luft. Sammenholdt med den mulige udvaskning og fordampning er det vanskeligt at vurdere koncentrationsændringerne af de tilstedeværende komponenter. For 1,1,1-TCA ses i det første år (1987) værdier af samme størrelsesorden, som i det anaerobe depot for samme tidsrum, maksimalt på ca. 3000 µg/l. Den seneste tid har koncentrationen været på ca. 100 µg/l, som er omkring det halve af koncentrationen i det anaerobe depot (200 µg/l) i samme periode. Koncentrationen af TCE har i hele perioden været mindre end i det anaerobe depot, dog med et fald i koncentration på ca. 50% af højeste værdi. Den samme tendens er gældende for PCE.

I Figur 5.6 er sammenhængen mellem dato for udtagne perkolatprøver og den målte koncentration af nedbrydningsprodukter vist.

Der er i det aerobe depot fundet 1,1-DCA fra tidligt i 1987. Koncentrationen udgør dog i hele perioden kun ca. 15% af den fundne mængde i det anaerobe depot for samme periode. Omtrent samtidigt er der påvist 1,1-DCE i koncentrationer af samme størrelsesorden som i



Figur 5.6: Tidsafhængig beskrivelse af formodede nedbrydningsprodukters forekomst i etape 2 (aerobt depot). 1,1-DCA( $\diamond$ ), cis 1,2-DCE( $\blacktriangle$ ) og 1,1-DCE( $\blacksquare$ )

det anaerobe depot. Der er også påvist cis-1,2-DCE dog i væsentligt lavere koncentrationer end i det anaerobe depot.

I det aerobe depot kan det ikke umiddelbart ud fra faldet i koncentration af forureningskomponenterne sluttes, at der er sket en mikrobiel omsætning. Som tidligere nævnt er depotet ikke overdækket, hvilket alene kan medføre en udvaskning og fordampning af komponenter. Samtidig er der dog påvist forekomst af samme type nedbrydningskomponenter som i det anaerobe depot.

Den mikrobiologiske undersøgelse viser, at bakteriernes vækstrate er sammenlignelig med vækstraterne hos bakterier i det anaerobe depot. I modsætning til det anaerobe depot ses den største vækstrate dog at foregå i den øverste del af depotet (se fig. 5.4).

Sammenholdes fundet af 1,1-DCA og 1,1-DCE med den bakterielle aktivitet ser det ud til, at der i det aerobe depot også er mulighed for en delvis nedbrydning af forureningskomponenterne. Hvorvidt denne nedbrydning foregår under mikrobiologisk aerobe eller anaerobe forhold eller ad kemisk vej kan ikke sluttes ud fra den mikrobiologiske undersøgelse, men på grund af depotets tykkelse kan der muligvis foregå anaerobe mikrobielle processer i dele af depotet. Det kan ikke udelukkes, at der har været en mindre mængde 1,1-DCA eller 1,1-DCE allerede ved depotets etablering. Små koncentrationer af disse stoffer findes ofte som urenheder i teknisk anvendt 1,1,1-TCA.

## 5.4 KONKLUSION.

Ved en skønsmæssig vurdering af nedbrydningshastigheden i det anaerobe depot fås for 1,1,1-TCA og TCE halveringstider på mellem 0,5 og 1,5 år. I det aerobe depot er det på grund af den mulige fordampning og udvaskning af komponenter ikke relevant at angive halveringstider på mikrobiologiske omdannelser. Generelt ses i begge depoter et betragteligt fald i koncentrationen af forureningskomponenterne over hele perioden. I det anaerobe depot, hvor den mikrobielle aktivitet er størst dannes betydelige mængder af nedbrydningsprodukterne, mens der i det aerobe depot fjernes forureningskomponenter samt eventuelle nedbrydningsprodukter ved udvaskning og fordampning.

Med henblik på anvendelse af ovennævnte metoder som afværgeforanstaltning på forurenede jord, så kan forureningskomponenterne under anaerobe forhold nedbrydes totalt, til gengæld opstår andre klorerede forbindelser, der kan være mere toksiske end den oprindelige forurening.

I det aerobe depot flyttes en stor del af komponenterne antagelig fysisk fra jordmediet til vand og luft. Desuden forløber forskellige processer, som af indlysende årsager har været vanskeligt styrbare, eksempelvis den delvis anaerobe omsætning af komponenterne. Set i sammenhæng med andre afværgeforanstaltningsteknikker må den biologiske anaerobe omsætning vurderes af fungere, men denne teknik er langsom, og der kan være problemer med dannelse af skadelige nedbrydningsprodukter.

Det vil være af interesse fortsat at kunne følge omsætningen af komponenterne i begge depoter eventuelt suppleret med yderligere mikrobiologiske undersøgelser.

## 6. ON-SITE NEDBRYDNING - OPPUMPET GRUNDVAND

Jens Andersen og Elin Dichmann Jensen, Kemp & Lauritzen A/S

### 6.1 INDLEDNING

I tilknytning til det etablerede rensningsanlæg ved Skrydstrup specialdepot blev der opstillet et pilotanlæg til forsøg med biologisk on-site rensning af oppumpet grundvand forurenet med klorerede alifater.

Formålet med forsøgene har været, at få en aerob bionedbrydning primært af triklorethylen (TCE) til at forløbe i et pilot-skala anlæg. Det har endvidere været formålet at påbegynde en optimering af denne nedbrydning.

Forsøgene har været opdelt i 2 faser. I 1. fase udførtes der forsøg med nedstrømsfiltre med antracit som filtermateriale. I 2. fase udførtes der forsøg med opstrømsfiltre med kvarts som filtermateriale. I det nedenstående er der kun præsenteret resultater fra 2. fase af forsøgene.

Anvendelsesperspektiverne for processen forventes især at ligge indenfor rensning af vand oppumpet ved afværgeforanstaltninger på forurenede industrigrunde og lignende. Hertil kommer en eventuel anvendelse på vandværker, hvor der forekommer klorerede alifater i råvandet.

Ved de idag hyppigst anvendte processer til fjernelse af klorerede alifater fra forurenet grundvand flyttes de klorerede alifater fra at være et vandforureningsproblem til at være et luftforureningsproblem. Til forskel herfra vil en fjernelse ved biologisk nedbrydning helt eliminere forureninger med klorerede alifater fra miljøet.

### 6.2 VANDKVALITETEN

I tabel 6.1 er der givet en oversigt over råvandskvaliteten ved Skrydstrup specialdepot. Oversigten er baseret på analyseresultater fra råvandsprøver udtaget fra de 4 borer, som anvendes til den afværgepumpning, der leverer vand til hovedrensningsanlægget, (se fig. 1.1). Det skal bemærkes, at råvandets indhold af klorerede alifater varierer på grund af afværgeboringernes forskellige placering i forhold til forureningsudbredelsen nedstrøms depotet.

Vandet til pilotanlægget tilledtes fra den første af ialt tre beluftere på hovedrensningsanlægget. I tabel 6.1 er der også angivet data for vandet herfra. For 2. fase af forsøgene er koncentrationerne af 1,1,1-TCA og TCE i indløbsvandet til forsøgsfiltrene vist på figur 6.1.

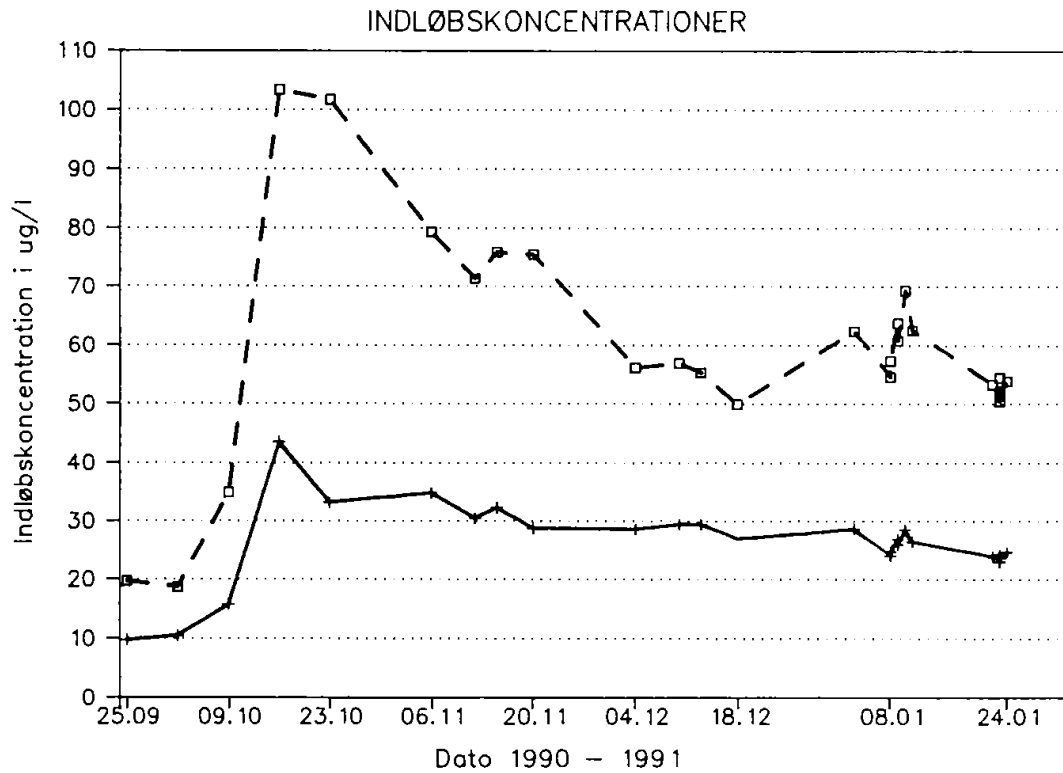
Tabel 6.1: Data for vandkvalitet

|   | Råvand, Skrydstrup specialdepot | Vand til pilotanlægget 2. fase |
|---|---------------------------------|--------------------------------|
| pH                                      | 6,5 - 7,5                       | 7,0 - 8,0                      |
| Ledningsevne    mS/m                    | 40 - 70                         |                                |
| Calcium            mgCa/l               | 50 - 110                        |                                |
| Magnesium        mgMg/l                 | 2 - 6                           |                                |
| Natrium            mgNa/l               | 6 - 17                          |                                |
| Kalium             mgK/l                | 0,4 - 1,2                       |                                |
| Ammonium         mgNH <sub>4</sub> /l   | 0,01 - 0,1                      |                                |
| Jern                mgFe/l              | 0,02 - 0,3                      | < 0,010                        |
| Mangan            mgMn/l                | 0,02 - 0,2                      | < 0,010                        |
| Kobber             µgCu/l               | ~ 1                             |                                |
| Bicarbonat        mgHCO <sub>3</sub> /l | 100 - 300                       |                                |
| Klorid             mgCl/l               | 20 - 40                         |                                |
| Fluorid            mgF/l                | ~ 0,1                           |                                |
| Sulfat             mgSO <sub>4</sub> /l | 40 - 60                         |                                |
| Nitrat             mgNO <sub>3</sub> /l | 20 - 50                         |                                |
| Nitrit             mgNO <sub>2</sub> /l | 0,01 - 0,1                      |                                |
| Fosfor, total      mgP/l                | 0,02 - 0,1                      |                                |
| Opløst ilt         mgO <sub>2</sub> /l  | 1-6                             | ~ 10                           |
| 1,1-DCA            µg/l                 | 10 - 100                        |                                |
| 1,1,1-TCA         µg/l                  | 100 - 2000                      | 20 - 100                       |
| 1,1-DCE            µg/l                 | 10 - 100                        |                                |
| TCE                µg/l                 | 100 - 500                       | 10 - 40                        |
| PCE                µg/l                 | 0,1 - 2                         |                                |

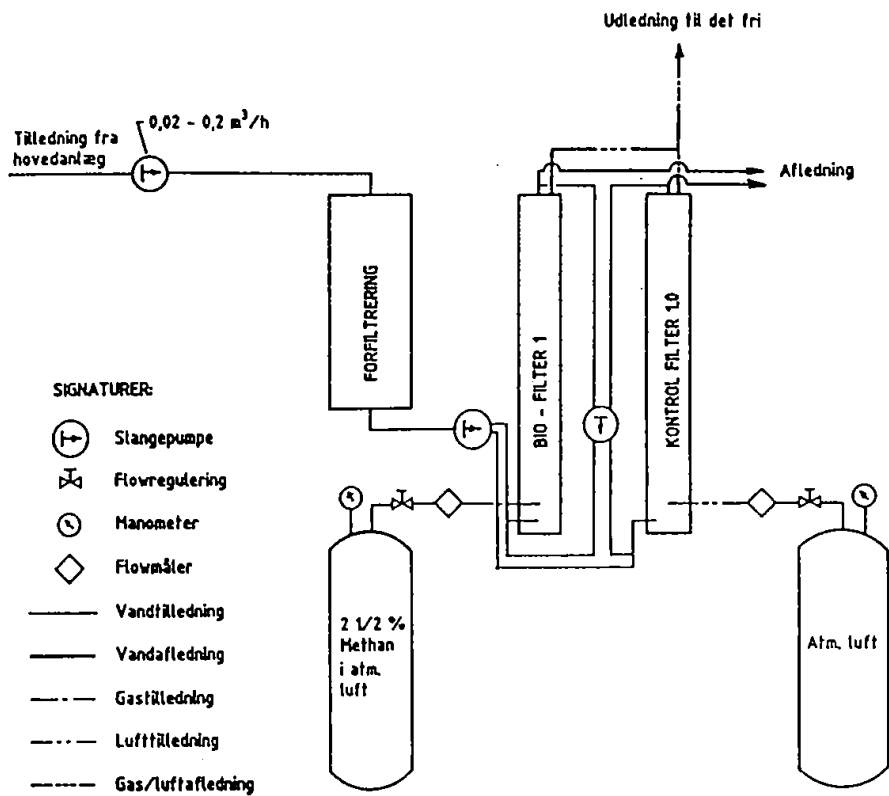
## 6.3 ON-SITE ANLÆGGET

### 6.3.1 Opbygning

På figur 6.2 er vist et procesdiagram for on-site anlægget (Kemp & Lauritzen A/S, 1991). Det forurenede (iltede) vand tilledtes et forfilter (med kvartssand) til fjernelse af jern og mangan. Fra forfiltret tilledtes ækvivalente vandmængder til to forsøgsfiltre i det følgende benævnt som bio- henholdsvis kontrolfilter. Anlægget er primært udført i materialerne glas og rustfrit stål. Pakninger og slanger er af materialet viton. Til biofiltret tilledtes methan som primært substrat for methanoxiderende bakterier. Methanen (2,5% vol./vol.) var opblandet i syntetisk luft (21% (vol./vol.) ilt og 79% (vol./vol.) kvælstof). Til kontrolfiltret tilledtes en ækvivalent mængde ren syntetisk luft. De to filtre blev iøvrigt behandlet ens. Der er i 2. fase udført forsøg med opstrøms filtre, hvor gas (methan/luft henholdsvis ren luft) blev tilført forsøgsfiltrene medstrøms vandtilledningen (se figur 6.2).



Figur 6.1: Koncentrationer af 1,1,1-TCA (□) og TCE (+) i indløbsvandet til on-site anlægget - 2. fase.



Figur 6.2: Procesdiagram for on-site anlægget - 2. fase.

### 6.3.2 Filter- og podemateriale.

Der er i 2. fase af forsøgene anvendt kvarts med en kornstørrelse på 2-3 mm som filtermateriale. Porøsiteten var 0.4 og materialets overflade var mindre end 1 m<sup>2</sup>/g.

Som podemateriale valgtes filtersand (kvarts) fra et forfilter på et vandværk i Nykøbing Sjælland. Forfiltret anvendes til behandling af methanholdigt grundvand. Forsøg udført på Afdeling for Generel Mikrobiologi ved Københavns Universitet havde vist, at materialet indeholdt en stor population af methan-oxiderende bakterier. Potentialet for nedbrydning af TCE blev undersøgt for podemateriale fra flere økosystemer (sø- og grundvandssedimenter samt materiale fra vandværksfilter). På baggrund af resultaterne fra disse undersøgelser valgtes filtermaterialet fra vandværksfiltret som podemateriale, idet potentialet for nedbrydning af TCE her var størst og endvidere forløb med et relativt lille methanforbrug (Aamand et al., 1989).

Ved 2. fase af forsøgene blev forsøgsfiltrene udelukkende påfyldt kvarts fra vandværksfiltret, som hermed fungerede både som pode- og filtermateriale.

## 6.4 FORSØGSDRIFT

### 6.4.1 Indkøring

2. fase af forsøgene blev indledt med en indkøringsperiode af ca. 1 måneds varighed, hvori de methan-oxiderende bakterier blev opformeret. Under opformeringen blev der målt methanforbrug i biofiltret. Forbruget anvendtes som udtryk for den biologiske aktivitet i filtret.

### 6.4.2 Omfang af forsøg

Med det formål at undersøge opholdstidens betydning for den biologiske aktivitet (methanforbruget) og for nedbrydningen af klorerede alifater i biofiltret er der udført forsøg med forskellige hydrauliske opholdstider ( $T_D$ ). Ved disse forsøg har gas/vandforholdet været holdt nogenlunde uændret på ca. 1.

Der er endvidere udført forsøg med alternerende drift. Der er her foretaget alternerende tilledning af methan, således at der er vekslet mellem at tillede henholdsvis at udelade tilledning af methan til biofiltret. Vandtilledningen er holdt uændret. Formålet med dette har været at undersøge de methan-oxiderende bakteriers nedbrydning af klorerede alifater under methanfrie forhold. Methan er en kompetitiv inhibitor for nedbrydningen af klorerede alifater. Det var derfor forventet, at nedbrydningen af de klorerede alifater ville forøges umiddelbart efter en udeladelse af methantilførelsen (Broholm et al., 1991; Strand et al., 1990).

### 6.4.3 Analysering

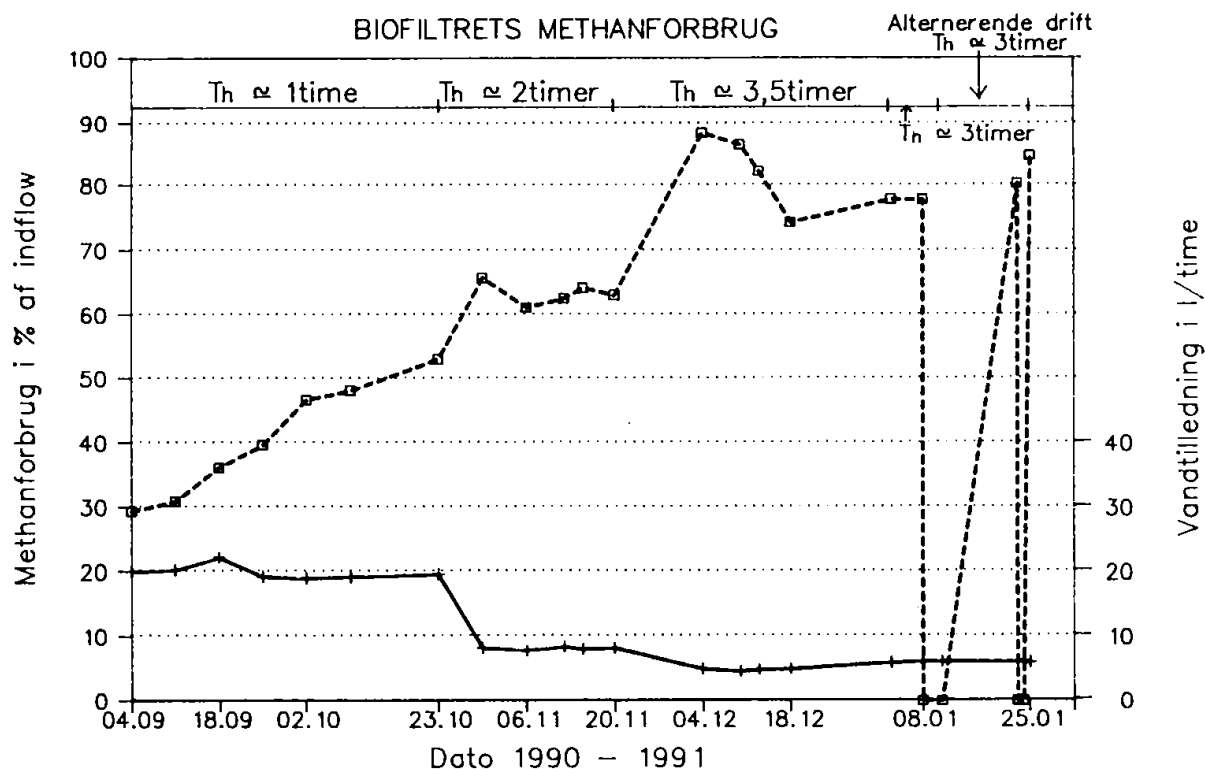
Indhold af methan i afgangsluften fra biofiltret blev analyseret på stedet (IR-sensor URAS 10E fra Hartmann & Braun). Indhold af methan i prøver fra afgangsvandet fra biofiltret blev analyseret ved gaschromatografi med flamme ionisations detektor (GC/FID). Indhold af



klorerede alifater i prøver fra indløbs- og afløbsvandet fra bio- og kontrolfiltret blev ekstraheret med pentan og analyseret ved gaschromatografi med electron capture detektor (GC/ECD). Indhold af klorerede alifater i afgangsluften fra bio- og kontrolfiltret blev opsamlet på aktivt kul i glasrør. Kullet blev elueret med svovlkulstof og analyseret ved gaschromatografi med flamme ionisations detektor (GC/FID).

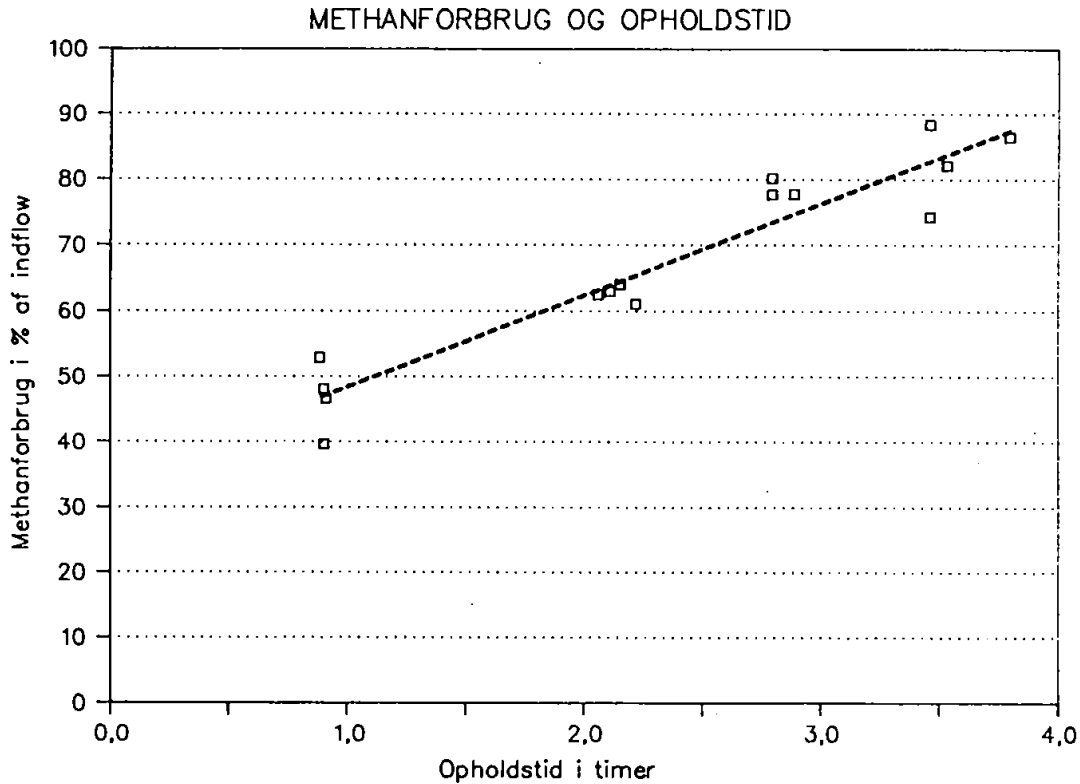
## 6.5 METHANFORBRUG

På figur 6.3 er biofiltrets methanforbrug vist. Forbruget er normeret i forhold til den tilladte methanmængde. På figuren er endvidere indtegnet vandtilledningen til biofiltret samt angivet en størrelsesorden for de heraf resulterende hydrauliske opholdstider ( $T_h$ ) i biofiltret. Den hydrauliske opholdstid er her beregnet som vandets opholdstid i forsøgskolonnerne uden hensyntagen til, at den tilladte gas "fortrænger" en del af vandet og dermed nedsætter den reelle hydrauliske opholdstid lidt. Af figuren ses det, at methanforbruget som ventet stiger, når den hydrauliske opholdstid øges.

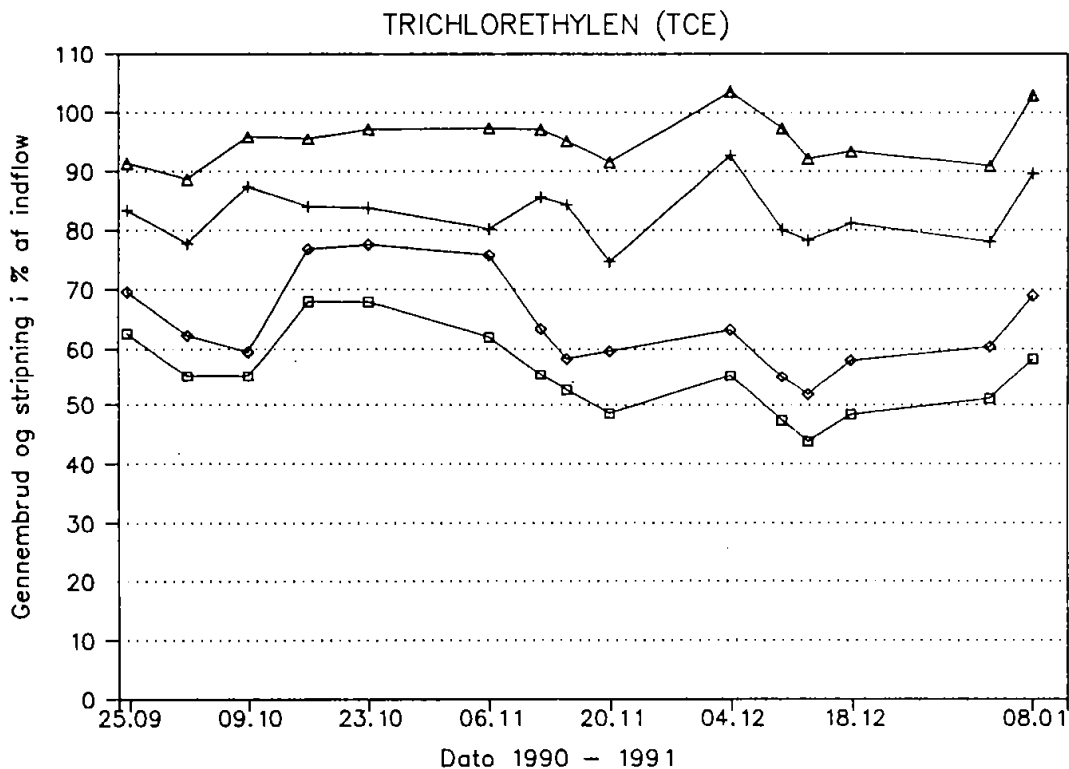


Figur 6.3: Methanforbrug i biofilteret ( $\square$ ) normeret i forhold til den tilladte methanmængde. Vandtilledning (+) og den heraf resulterende hydrauliske opholdstid i biofiltret er varieret ( $T_h=1$ ,  $T_h=2$ ,  $T_h=3$  og  $T_h=3,5$ ). Gas/vandforholdet er ca. 1.

På figur 6.4 er det procentvise methanforbrug indtegnet som funktion af den hydrauliske opholdstid. Det skal her nævnes, at de første tre målepunkter på kurven for methanforbrug på figur 6.3 stammer fra indkøringsperioden (se afsnit 6.4.1). Disse måledata er derfor ikke medtaget på figur 6.4. Der er lavet lineær regression på det procentvise methanforbrug i afhængighed af den hydrauliske opholdstid. På figur 6.4 er den resulterende regressionslinie



Figur 6.4: Methanforbrug i biofiltret (□) som funktion af hydraulisk opholdstid ( $T_D$ ). Methanforbruget er normeret i forhold til den tilledte methanmængde. Endvidere er indtegnet regressionslinie mellem punkterne.



Figur 6.5: Gennembrud (□) og gennembrud+stripping (◇) af TCE på biofiltret samt gennembrud (+) og gennembrud+stripping (△) af TCE på kontrolfiltret ved forsøg med opholdstiden ( $T_D$ ). Gennembrud er beregnet som den mængde TCE, der fjernes fra filtrene med afløbsvandet. Stripping er beregnet som den mængde TCE, der fjernes fra filtrene med afgangsluften. Opholdstiden er varieret som angivet på figur 6.3.

indtegnet. Regressionsliniens hældning er signifikant forskellig fra 0 på alle niveauer større end 0,1% i et interval for opholdstiden på 1 - 4 timer. Der er således konstateret sammenhæng mellem opholdstiden og methanforbruget. I den sidste del af forsøgene falder methanforbruget til 0% i to omgange (to perioder uden methantilledning). Der er her som skitseret på figur 6.3 tale om forsøgsdrift med alternerende tilledning af methan (se afsnit 6.4.2). Ved genoptagelsen af methantilledningen ses der et methanforbrug på samme niveau som forbruget umiddelbart før stop for methantilledning. På baggrund heraf er det vurderet, at udeladelse af methantilledning i kortere perioder ingen effekt har på den biologiske aktivitet i biofiltret.

## 6.6 RESULTATER FRA FORSØG MED OPHOLDSTIDEN

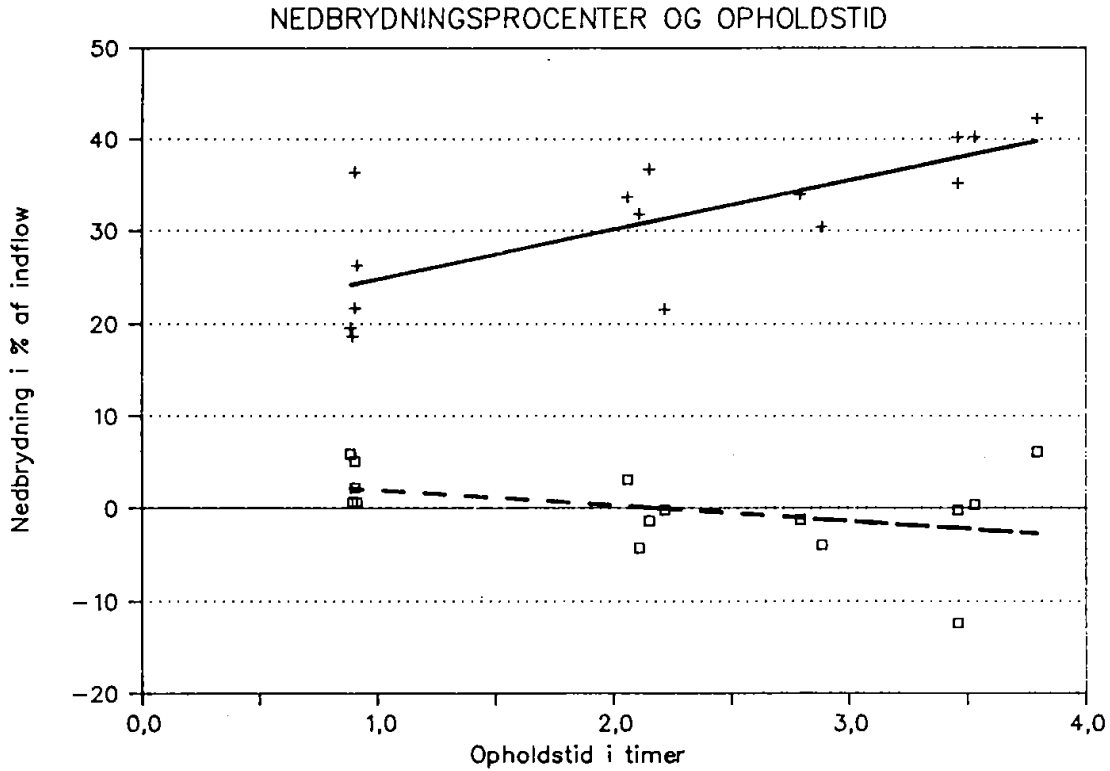
For TCE er der på figur 6.5 vist gennembrud og stripning for bio- og kontrolfiltret for forsøgene med forskellige hydrauliske opholdstider ( $T_D$ ). Gennembrud er beregnet som den mængde TCE der findes i afløbsvandet fra henholdsvis bio- og kontrolfiltret. Stripning er beregnet som den mængde TCE, der findes i afgangsluften fra henholdsvis bio- og kontrolfiltret. Gennembrud samt gennembrud+stripning er normeret i forhold til den tilledte mængde af TCE. Kurven for gennembrud+stripning for kontrolfiltret ligger omkring 100%, hvilket viser, at der kan opstilles en god massebalance for filtret. Differencen mellem værdierne for gennembrud+stripning for henholdsvis bio- og kontrolfiltret er taget som udtryk for den nedbrydning af TCE, der har fundet sted i biofiltret (nedbrydningsprocenterne). For 1,1,1-TCA er nedbrydningsprocenterne beregnet på helt tilsvarende vis.

På figur 6.6 er de beregnede nedbrydningsprocenter for 1,1,1-TCA og TCE indtegnet som funktion af den hydrauliske opholdstid. Der er lavet lineær regression på nedbrydningsprocenterne i afhængighed af den hydrauliske opholdstid. På figuren er de resulterende regressionslinier indtegnet. For 1,1,1-TCA er regressionsliniens hældning ikke signifikant forskellig fra 0 på niveauer mindre end 10%. Endvidere ligger linien lige omkring 0%. Det vurderes på denne baggrund, at der i forsøgsperioden ikke har været nogen væsentlig nedbrydning af 1,1,1-TCA i biofiltret. For TCE er regressionsliniens hældning derimod signifikant forskellig fra 0 på alle niveauer større end 1% i et interval for opholdstiden på ca. 1 - 4 timer. Der er således konstateret sammenhæng mellem opholdstiden og nedbrydningen af TCE.

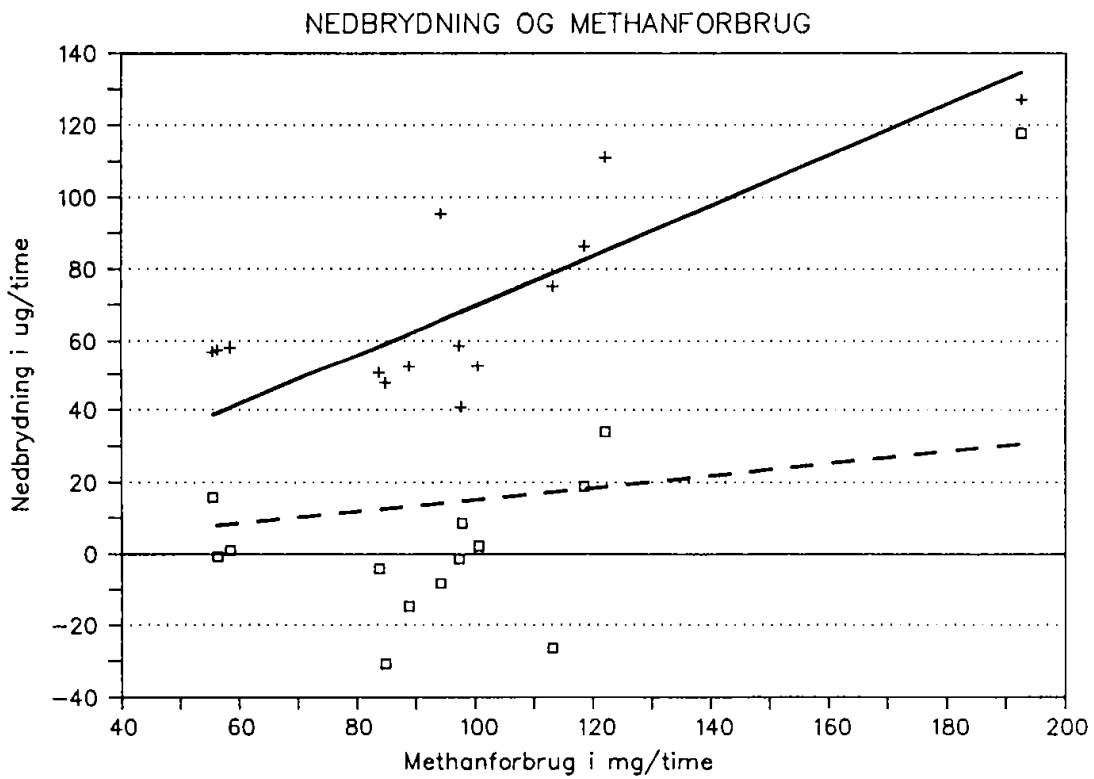
På figur 6.7 de beregnede nedbrydningsprocenter for 1,1,1-TCA og TCE omregnet til absolutte værdier (i  $\mu\text{g}/\text{time}$ ) indtegnet som funktion af methanforbruget omregnet til absolutte værdier (i  $\text{mg}/\text{time}$ ). Der er her lavet lineær regression på de absolutte værdier for nedbrydningen i afhængighed af de absolutte værdier for methanforbruget. På figur 6.7 er de resulterende regressionslinier indtegnet. Der er endvidere lavet lineær regression på nedbrydningsprocenterne i afhængighed af det procentvise methanforbrug. For disse to regressionsanalyser er der opnået helt tilsvarende resultater som omtalt ovenfor for den hydrauliske opholdstid. Dette er ikke overraskende, idet der er konstateret en lineær sammenhæng mellem methanforbruget og den hydrauliske opholdstid (se afsnit 6.5).

For TCE er der ved regressionsanalysen konstateret følgende lineære sammenhæng mellem de absolutte værdier af methanforbruget og nedbrydningen af TCE:

$$\text{Nedbrydning af TCE i } \mu\text{g}/\text{time} = 0,7 \cdot \text{methanforbruget i mg}/\text{time}.$$



Figur 6.6: Relativ nedbrydning af 1,1,1-TCA (□) og TCE (+) i biofiltret som funktion af hydraulisk opholdstid ( $T_h$ ). Endvidere er indtegnet regressionslinier mellem punkterne.



Figur 6.7: Nedbrydning af 1,1,1-TCA (□) og TCE (+) i biofiltret som funktion af methanforbrug. Methanforbruget er varieret ved at variere den hydrauliske opholdstid ( $T_h$ ). Endvidere er indtegnet regressionslinier mellem punkterne.

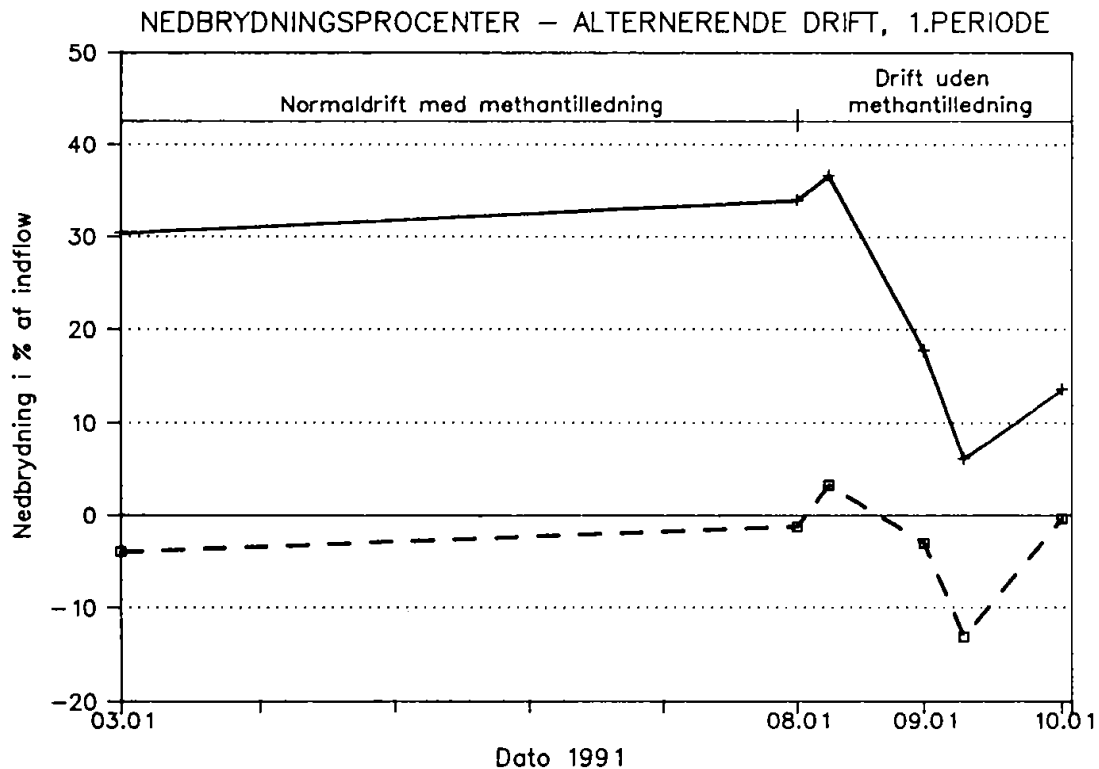
Lineariteten er konstateret i et interval for methanforbruget på ca. 50 - 200 mg/time.

På baggrund af de opnåede resultater er det ikke muligt at vurdere, om forøget nedbrydning af TCE primært opnås ved en længere opholdstid (længere kontaktid) eller ved et større methanforbrug (større biomasse). Det må dog forventes, at både længere opholdstid og større methanforbrug (større biomasse) vil resultere i en forøget nedbrydning af TCE.

Resultaterne af forsøgene med opholdstiden vil i en vis udstrækning kunne anvendes ved en dimensionering af et fuldskala anlæg. Det skal dog i denne sammenhæng bemærkes, at eksempelvis resultaterne indtegnet på figur 6.6 ikke umiddelbart kan ekstrapoleres uden for intervallet for opholdstiden, hvis man ønsker at opnå en højere nedbrydningsprocent. Dette skyldes, at det ikke er givet, at lineariteten er gældende uden for intervallet. Det er ligeledes relevant at gøre opmærksom på, at forsøgene er udført indenfor et givet interval for indløbskoncentrationen af de klorerede alifater (se figur 6.1 og tabel 6.1). Forsøgene har ikke afdækket, i hvilken udstrækning nedbrydningen af TCE er afhængig af indløbskoncentrationen af TCE samt af de øvrige klorerede alifater. Samme forhold gør sig gældende for vandkvaliteten iøvrigt.

## 6.7 RESULTATER FRA FORSØG MED ALTERNERENDE DRIFT

På figur 6.8 er de beregnede nedbrydningsprocenter for 1,1,1-TCA og TCE fra et forsøg med alternerende drift indtegnet. Den hydrauliske opholdstid blev holdt uændret på ca. 3 timer. De første to punkter på kurven repræsenterer nedbrydningen af 1,1,1-TCA henholdsvis TCE under forsøgsdrift med tilledning af methan umiddelbart før en periode uden tilledning af methan.



Figur 6.8: Relativ nedbrydning af 1,1,1-TCA (□) og TCE (+) i biofiltret ved alternerende drift. Methantilledningen er standset den 8-1-1991.

Af figuren ses det, at den alternerende drift ikke har nogen væsentlig effekt på nedbrydningen af 1,1,1-TCA. Det ses endvidere, at nedbrydningen af TCE stort set er uforandret lige efter ophør af methantilledningen, samt at nedbrydningen er aftagende efter ca. 1 døgn uden methantilledning. Den alternerende drift har således ikke vist nogen positiv effekt på nedbrydningen af TCE under de forhold, der har været anvendt ved forsøgene. Tilsvarende resultater er fundet ved amerikanske forsøg (Canter et al., 1990).

Den aftagende nedbrydning af TCE efter ca. 1 døgn kan være forårsaget af, at de methanoxiderende bakterier ikke har nogen tilgængelig energikilde, når methantilledningen er standset. En effekt af alternerende drift kan derfor være betinget af tilførsel af en anden energikilde i perioderne uden methantilledning. Som energikilde kunne det her være relevant at anvende eksempelvis methanol eller format (Semprini et al., 1991). Den manglende effekt af alternerende drift kan endvidere være forårsaget af, at den kompetitive inhibering ved drift med tilledning af methan har været meget lav. Effekten af at standse methantilledningen vil dermed være lille. Det skal bemærkes, at den alternerende drift har en effekt i relation til methanforbruget, idet nedbrydningen af TCE som vist opretholdes i en periode efter ophør af methantilledning. Sammenlignet med drift med kontinuert tilledning af methan vil der således ved alternerende drift kunne opnås en tilsvarende nedbrydning af TCE med et lavere methanforbrug.

## 6.8 KONKLUSION

Ved forsøgene med on-site anlægget er der målt forbrug af methan på mellem 40 og 90% af den tilledte mængde. Der er konstateret en lineær sammenhæng mellem hydraulisk opholdstid og methanforbrug i et interval for opholdstiden på 1 - 4 timer.

Hverken ved forsøg med opholdstiden eller forsøg med alternerende drift er der set nogen væsentlig nedbrydning af 1,1,1-TCA. Modsat hertil er der set en betydelig nedbrydning af TCE på mellem 20 og 40% af den tilledte mængde svarende til en absolut nedbrydning af TCE på mellem 40 og 130  $\mu\text{g}/\text{time}$ . Der er endvidere konstateret en lineær sammenhæng mellem:

- hydraulisk opholdstid og nedbrydning af TCE i et interval for opholdstiden på 1 - 4 timer,
- procentvist methanforbrug og nedbrydningsprocenter for TCE i et interval for methanforbruget på 40 - 90% af den tilledte methanmængde,
- absolutte værdier af methanforbrug og nedbrydning af TCE i et interval for methanforbruget på 50 - 200  $\text{mg}/\text{time}$ .

Ved alternerende drift er der set samme nedbrydning af TCE i perioder med og uden methantilledning. Den alternerende drift har således ikke vist nogen positiv effekt på nedbrydningen af TCE under de forhold, der har været anvendt ved forsøgene.

## 6.9 PERSPEKTIVER

Det er vist, at en øget biomasse vil give en relativt større nedbrydning af TCE. Ved forsøgene kan biomassens vækst have været begrænset af tilgængeligheden af næringsalte

(kvælstof, fosfor, jern med mere). En tilførsel af næringssalte til systemet vil derfor være en nærliggende mulighed for at optimere udnyttelse af den tilførte methan og dermed få opbygget en større biomasse. Filtermaterialets art, struktur og overflade har ligeledes betydning for biomassens størrelse.

Det største methanforbrug i systemet vil sandsynligvis findes på det sted i filtret, hvor methantilledningen foretages. Under driftsforhold, hvor biomassens vækst ikke er begrænset af for eksempel tilgængelighed af næringssalte, kan der derfor sandsynligvis opnås en større biomasse ved at foretage methantilledningen flere steder i filtret. Alternativt hertil kunne det være fordelagtigt at etablere flere filtre i serie.

Ved laboratorieforsøg er det vist, at der er et potentiale for at øge nedbrydningen af TCE ved alternerende drift (Broholm et al., 1991). Ved forsøgene med on-site anlægget har dette ikke kunne eftervises, hvilket kan være forårsaget af, at bakterierne ikke har haft nogen tilgængelig energikilde i perioderne uden methantilledning. En mulighed for at øge nedbrydning af TCE kunne derfor være alternerende drift med tilledning af eksempelvis methanol eller format i perioderne uden methantilledning (Semprini et al., 1991). Det skal dog bemærkes, at en tilledning af eksempelvis methanol eller format ikke vil være uproblematisk, idet en sådan tilledning kan medføre u hensigtsmæssigt stor vækst af heterotrofe bakterier.

Ved laboratorieforsøg er det endvidere vist, at methan-oxiderende bakterier kan nedbryde relativt større mængder TCE under forhold, hvor deres vækst er begrænset af tilgængeligheden af kobber (Oldenhuis et al., 1989; Tsien et al., 1989). En mulighed for at øge nedbrydningen af TCE kan derfor også være at etablere driftsbetingelser, hvor kobber fjernes fra det forurenede vand, inden vandet ledes til filtre med methan-oxiderende bakterier. Det skal bemærkes, at de kobberkoncentrationer, der har været i vandet ved forsøgene med on-site anlægget, har været så lave, at denne effekt nok allerede er opnået.

Det er ved forsøgene vist, at det er muligt at nedbryde TCE ved en aerob biologisk proces. Det er endvidere sandsynligt, at andre klorerede alifater med lavere kloringsgrad også kan nedbrydes - heriblandt klorethylen (vinylklorid) (Vogel et al., 1987).

## 7. VURDERING AF BIOLOGISK NEDBRYDNING

Jens Aamand, Afdeling for Generel Mikrobiologi (AGM) Københavns Universitet  
Kim Broholm, Laboratoriet for teknisk Hygiejne (LtH), DTH.

### 7.1 ANAEROBE FORHOLD

Det er ved laboratorieforsøg, med materiale fra et forurenede grundvandsmagasin og anaerobt spildevandsslam, blevet vist, at stofferne tetraklorethylen (PCE), triklorethylen (TCE) og 1,1,1-triklorethan (TCA) kan nedbrydes under anaerobe forhold. Ved processen ophobes midlertidigt lavere klorerede stoffer.

Den anaerobe nedbrydning af de klorerede opløsningsmidler kan fremmes ved tilsætning af en primær kulstofkilde. Størst stimulering blev opnået ved tilsætning af butyrat, laktat, glucose, ethanol, format og succinat. Ved den anaerobe omsætning af disse kulstofkilder produceres hydrogen. Da hydrogen indgår som reaktant i den reductive deklorering og har vist sig at have en stimulerende virkning på dekloreringen, vil primærsubstrater, hvis omsætning medfører produktion af hydrogen, være de mest velegnede ved en anaerob behandling af forurenede grundvandsmagasiner. Mange anaerobe miljøer (lossepladser, sedimentter etc.) indeholder imidlertid i forvejen meget organisk stof, og det vil i sådanne tilfælde ikke være nødvendigt at tilføre yderligere kulstofkilder.

Det var dog ikke muligt at opnå anaerob nedbrydning af hverken PCE, TCE, eller TCA i laboratorieforsøg med grundvandssediment fra Skrydstrup. Dette kan skyldes, at grundvandet ved Skrydstrup indeholder ilt i den øverste del af magasinet, og relativt meget nitrat og sulfat. Tilstedeværelse af disse stoffer medfører et højt redoxpotentiale, d.v.s. at et strengt anaerobt miljø ikke har haft mulighed for at udvikles.

Forsøg med en anaerob kultur beriget fra et forurenede grundvandsmagasin (Mørkhøj bygade) har således vist, at anaerob nedbrydning af PCE og TCE var alvorligt hæmmet af henholdsvis nitrat og sulfat.

Anaerob in-situ oprensning af grundvand forurenede med klorerede alifater vil således være mest hensigtsmæssigt at gennemføre i grundvandsmagasiner uden ilt og med et lavt indhold af nitrat og sulfat. Er der i miljøet et lavt indhold af letomsætteligt organisk kulstof, vil processen kunne fremmes ved tilsætning af et eller flere primærsubstrater.

I det anaerobe depot ved Skrydstrup observeredes ophobning af lavere klorerede alifater samtidig med, at der skete et fald i koncentrationen af både TCE og 1,1,1-TCA. Nedbrydningen forløb med en estimeret halveringstid på mellem 0,5 og 1,5 år. Det er uafklaret, om stofferne dekloreres fuldstændigt, hvilket er et problem, da flere af de lavere klorerede alifater er mere toksiske end den oprindelige forurening med TCE og 1,1,1-TCA. Det vil



derfor være nødvendigt med yderligere undersøgelser til belysning af, hvordan ophobning af lavere klorerede alifater kan formindskes eller helt undgås.

## 7.2 AEROBE FORHOLD

Det er blevet vist, at TCE kan nedbrydes af methan-oxiderende bakterier under aerobe forhold, mens nedbrydning af TCA kun blev observeret i mindre grad. Lavere klorerede alifater som diklorethylener og vinylklorid vil sandsynligvis være let nedbrydelige under aerobe forhold.

Nedbrydningshastigheden kunne forøges op til 88 gange, når bakterierne voksede i medie uden kobber. Årsagen til denne stimulering er, at de methan-oxiderende bakterier ved kobbermangel skifter fra et enzymsystem med lav affinitet for TCE-nedbrydning til et andet enzymsystem med høj affinitet for TCE-nedbrydning. I grundvandet ved Skrydstrup er der fundet kobberkoncentrationer på omkring 1  $\mu\text{g/l}$ , og det er ikke sandsynligt, at så små koncentrationer vil hæmme den aerobe omsætning.

Der er flere steder fundet koncentrationer af klorerede alifater, der kan være hæmmende for de methan-oxiderende bakterier. Det blev således vist, at koncentrationer af TCE over 13 mg/l fuldstændig hæmmede vækst og methanforbrug af en blandingskultur af methan-oxiderende bakterier.

Der blev ikke påvist noget potentiale for aerob nedbrydning af hverken TCE eller TCA i forsøg, hvor materiale fra grundvandet ved Skrydstrup blev brugt som inoculum. Den mikrobielle population i grundvandsmagasinet er formodentligt domineret af aerobe og denitrificerende bakterier, og der findes således ingen methanproducerende (methanogen) bakteriell population. Fravær af en aktiv methanproducerende zone betyder, at der ikke er noget vækstgrundlag for methan-oxiderende bakterier, og dette er sandsynligvis forklaringen på det manglende potentiale for aerob nedbrydning af TCE.

Aerob in-situ behandling af grundvandet ved Skrydstrup vil kræve tilførsel af methan og podning af grundvandet med methan-oxiderende bakterier. Det vil sandsynligvis være muligt at opformere disse bakterier i grundvandet, og væksten vil kunne fremmes ved tilsætning af forskellige næringssalte som f.eks. phosphor.

I søjler pakket med forurenede jord fra den umættede zone var det ved tilførsel af methan og atmosfærisk luft muligt at opformere en population af methan-oxiderende bakterier, der var i stand til at nedbryde både TCE og 1,1,1-TCA. Der blev opstillet søjler med og uden recirkulering af methan og luft. I søjler uden recirkulering blev en del af de klorerede alifater fjernet ved stripping. Dette blev undgået i søjler med recirkulering, og samtidig observeredes den største nedbrydning i disse søjler. Recirkulering af methan/luft vil imidlertid være vanskelig at gennemføre ved in-situ rensning af umættet jord. Ved rensning uden recirkulering kan strippingen minimeres ved at sænke det nødvendige gasflow gennem jorden. Dette

kan gøres ved at optimere den biologiske proces, så methanforbruget minimeres, eller ved at ændre gasblandingen, således at der tilsættes ren ilt i stedet for luft. Laboratorieforsøg har vist, at methan hæmmer nedbrydningen af TCE, mens methan samtidig er nødvendig for at opformere de methan-oxiderende bakterier. Alternierende methantilsætning kan muligvis forøge nedbrydningseffektiviteten og være med til at minimere strippingen. Alternierende methantilsætning medførte dog ingen forøgelse af TCE-nedbrydningshastigheden i det etablerede pilotanlæg ved Skrydstrup.

Anvendelse af andre primærsubstrater som methanol og format i stedet for methan kunne også være en mulighed til at minimere gasflowet gennem jorden. Disse substrater vil dog medføre vækst af andre bakterier, og det var i laboratorieforsøg ikke muligt igennem længere tid at opretholde nedbrydningen af TCE med disse substrater.

Laboratorieforsøgene har sandsynliggjort, at in-situ nedbrydning af klorerede alifater er mulig. Metoden mangler dog at blive afprøvet og optimeret i et kontrolleret feltforsøg, specielt med henblik på at minimere strippingen.

I on-site anlægget til behandling af forurenede grundvand var det muligt at opnå en nedbrydning af TCE på 40% af inflow ved en hydraulisk opholdstid på 3,5 time. Samtidig observeredes et methanforbrug på 85% af inflow. Der sås ingen nedbrydning af TCA i anlægget.

I modsætning til i laboratorieforsøgene observeredes der ingen forøgelse af TCE-nedbrydningshastigheden ved alternierende methantilsætning. Dette kan skyldes, at methan tilføres filteret som gas, og koncentrationen af methan i væsken er styret af diffusionen af methan fra gasfasen til væskefasen. Vand og gasprøver fra udløbet af filteret viste, at der ikke var ligevægt imellem de to faser. Det er derfor muligt, at koncentrationen af methan i væsken allerede er så lav, at der ikke kan opnåes nogen yderligere nedbrydning af TCE ved alternierende methantilførelse.

Nedbrydningen kan sandsynligvis optimeres ved at tilføre næringsstoffer som f.eks. phosphor til indløbsvandet.

Det vil være muligt at forbedre nedbrydningseffektiviteten ved at placere flere filtre i serie. Antages det, at hver filter fjerner 40% af inflow, kræves der 4 filtre for at fjerne ca. 85% TCE. Det vil være mest hensigtsmæssigt at fjerne den sidste rest af forureningen ved ikke-biologiske metoder som f.eks. med aktivt kul.

I det aerobe depot observeredes en mindre ophobning af anaerobe nedbrydningsprodukter i form af lavere klorerede alifater. Tilsyneladende indeholder depotet mikronicher, hvor anaerob omsætning kan forløbe. Det er imidlertid vanskeligt at vurdere, hvor meget der er biologisk omsat, og hvor meget der er fjernet ved fordampning og udvaskning fra dette depot.

Konkluderende kan siges, at en fuldstændig biologisk omsætning af klorerede alifater kræver et samspil af aerobe og anaerobe processer. In-situ nedbrydning af jord/grundvand forurenet med klorerede alifater vil derfor være mest lovende i miljøer, hvor der findes en dybere liggende, anaerob, methanproducerende zone. Her kan højere klorerede forbindelser som PCE og TCA omsættes. Den producerede methan vil diffundere op mod de aerobe lag og kan her understøtte vækst af methan-oxiderende bakterier, samtidig med at lavere klorerede alifater nedbrydes. Yderligere undersøgelser er imidlertid nødvendige for at belyse, den rumlige placering af henholdsvis de aerobe og anaerobe processer.

## REFERENCELISTE

- Aamand J. 1988.** Mikrobiel omdannelse af chlorerede aliphatiske opløsningsmidler under denitrificerende- og methanogene forhold Forsøgsnotat. Lossepladsprojektet.
- Aamand, J., H.-J. Albrechtsen og T. Madsen. 1989.** Laboratorieundersøgelser af nedbrydningspotentiale i forskellige podematerialer. Forprojekt til ON SITE rensning af grundvandet ved Skrydstrup Specialdepot. Forsøgsnotat. Lossepladsprojektet.
- Aamand, J., T. Madsen og J. C. Nielsen. 1990.** Biologisk rensning af vand forurenet med chlorerede aliphater. ATV rapport: Chlorerede opløsningsmidler - forurening og afværgeforanstaltninger 4. oktober 1990. 169-180.
- Aamand J. og A. Winding 1991.** Mikrobiologiske undersøgelser af Skrydstrup specialdepot. Forsøgsnotat.
- Bailey, J. E. og D. F. Ollis. 1977.** Biochemical engineering fundamentals. McGraw-Hill Book Co., Inc., Tokyo.
- Bedard, C. og R. Knowles. 1989.** Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbio. Rev.*, Mar.: 68-84.
- Belay, N. og L. Daniels. 1987.** Production of ethane, ethylene, and acetylene from halogenated hydrocarbons by methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53. 1604-1610.
- Borden, R. C. og P. B. Bedient. 1986.** Transport of dissolved hydrocarbons influenced by oxygen-limited biodegradation. 1. Theoretical development. *Water Res.* 22. 1973-1982.
- Broholm, K.** Klorerede hydrokarboner i grundvand. I: E. Dahi (ed.), Vandforurening med miljøgifte, Polyteknisk Forlag 1989.
- Broholm, K., B. K. Jensen, T. H. Christensen og L. Olsen. 1990.** Toxicity of 1,1,1-Trichloroethane and Trichloroethene on a Mixed Culture of Methane-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56. 1709-1714.
- Broholm, K., T. H. Christensen og B. K. Jensen. 1991.** Modelling TCE degradation by a mixed culture of methane-oxidizing bacteria. Sendt til Water Research, april 1991.
- Brunner, W., D. Staub og T. Leisinger. 1980.** Bacterial degradation of dichloromethane. *Appl. Environ. Microbiol.* 40. 950-958.
- Canter, L. W., L. E. Streebin, M. C. Arquiga, F. E. Carranza, D. E. Miller og B. H. Wilson. 1989.** Innovative processes for reclamation of contaminated subsurface environments. Dept. of Civil Engineering and Environmental Science, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma. EPA/600/2-90/017.

**Canter, L. W., L. E. Streebin, M. C. Arquiaga, F. E. Carranza, D. E. Miller og B. H. Wilson.** 1990. Innovative processes for reclamation of contaminated subsurface environments. Robbert S. Kerr, Environmental Research Laboratory, Ada, Oklahoma, USA.

**Christiansen, K og S. Vedby.** 1987. Skrydstrup chemical waste disposal site and development program in the provins of Soenderjylland, Denmark. Presented at The First International Meeting of the NATO/CCMS Pilot Study on Remedial Action Technologies for Contaminated Land and Groundwater, september 1987.

**Dalton H. og D. I. Stirling.** 1982. Co-metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **297.** 481-496.

**DGU.** 1988. Botesam boring ved Skrydstrup Mark DGU nr. 151.1033. Redoxforholdene i et sandreservoir med frit grundvandsspejl. Danmarks Geologiske Undersøgelse, Miljøministeriet.

**Fathepure, B. Z. og S. A. Boyd.** 1988. Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol. lett.* **49.** 149-156.

**Fathepure, B. Z., J. P. Nengy og S. A. Boyd.** 1987. Anaerobic bacteria that dechlorinate perchlorethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53.** 2671-2674.

**Freedman, D. L. og J. M. Gossett.** 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55.** 2144-2151.

**Fogel, M. M., A. R. Taddeo, and S. Fogel.** 1986. Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **51:**720-724.

**Gosset, G. M.** 1987. Measurement of Henry's law constants for C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **21.** 202-208.

**Gälli, R. og P. L. McCarty.** 1989. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **55.** 837-844

**Gälli, R. og P. L. McCarty.** 1989. Kinetics of biotransformation of 1,1,1-trichloroethane by *Clostridium* sp. strain TCAIIB. *Appl. Environ. Microbiol.* **55.** 845-851.

**Harker, A. R. og Y. Kim.** 1990. Trichloroethylene degradation by two independent aromatic-degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* **56.** 1179-1181.

**Henson, J. M., M. V. Yates, J. W. Cochran, and D. L. Shackelford.** 1988. Microbial removal of halogenated methanes, ethanes, and ethylenes in an aerobic soil exposed to methane. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53:**193-201.

Henson, J. M., M. V. Yates, and J. W. Cochran. 1989. Metabolism of chlorinated methanes, ethanes, and ethylenes by a mixed bacterial culture growing on methane. *J. Ind. Microbiol.* 4:29-36.

Janssen, D. B., A. Scheper, L. Dijkhuizen og B. Witholt. 1985. Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Environ. Microbiol.* 49. 673-677.

Jensen, E. D., J. N. Andersen og T. Vinberg. 1990. Rensning af forurenede grundvand fra kemikalieaffaldsdepot. *Vandteknik*.3

Jørgensen, C. 1990. Methanotrofe bakteriers nedbrydning af trichlorethylen. Speciale rapport, Afdeling for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.

Kemp & Lauritsen A/S. 1991. Skrydstrup specialdepot. Projekt 1. On-site biologisk nedbrydning af klorerede alifater i grundvand. Afrapportering til Lossepladsprojektet. Maj 1991.

Kjeldsen, P. og T. Larsen. 1988. Sorption af organiske stoffer i jord og grundvand. Rapport P5-1, Lossepladsprojektet, Miljøstyrelsen.

Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall, and P. J. Gilmer. 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:951-956.

Mackay, D. og W. Y. Shiu. 1981. A critical review of Henry's law constant for chemicals of environmental interest. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 10. 1175-1199.

Miljøministeriet. 1988. Bekendtgørelse om vankvalitet og tilsyn med vandforsyningsanlæg. Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 515 af 29. august 1988.

Miljøstyrelsen. 1990. 4. udkast til Branchevejledninger 7/12-1990.

Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery og P. H. Pritchard. 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54. 604-606.

Nielsen J.C., J. Aamand og T. Madsen. 1990. Anvendelse af methan-oxiderende bakterier til rensning af grundvand, der er forurenede med klorerede alifater. Forsøgsnotat. Lossepladsprojektet.

Nyland, B. A. 1989. Forureningskomponenter i opsamlingsdepotet Skrydstrup. Danmarks Miljøundersøgelser.

Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vink, D. Janssen, and B. Witholt. 1989. Degradation of Chlorinated Hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane

Monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2819-2826.

**Semprini, L., Hopkins, G.D., Roberts, P.V., Grbic-Galic, D. & McCarty, P.L., 1991.** A Field Evaluation of In-Situ Biodegradation of Chlorinated Ethnes: Part 3, Studies of Competitive Inhibition. *Ground Water*, **29**, 239-250.

**Schultz, B. og P. Rank.** 1990. Kilder og forekomst med udgangspunkt i undersøgelse af grundvandskvaliteten i Københavns Amt. 1-16. I: Chlorerede opløsningsmidler, forurening og forekomst. ATV-komiteen vedr. grundvandsforurening, SAS Scandinavia Hotel, 4. oktober.

**Strand, S. E., M. D. Bjelland, and H. D. Stensel.** 1990. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by suspended cultures of methane-oxidizing bacteria. *Research Journal WPCF.* **62**:124-129.

**Strand, S. E., and L. Shippert.** 1986. Oxidation of chloroform in an aerobic soil exposed to natural gas. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:203-205.

**Strøbæk, N., 1989.** Skrydstrup specialdepot. Ergaringer fra undersøgelser og afværgeforanstaltninger. Udredningsrapport U7. Sønderjyllands amtskommune.

**Sønderjyllands Amtskommune.** 1987a. Skrydstrup Kemikalieaffaldsdepot reg. nr. 543-01. Tage Sørensen, Rådgivende Ingeniører A/S, april 1987.

**Sønderjyllands Amtskommune.** 1987b. Skrydstrup opsamlingsdepot, rapport over indkøringsperiode II. Miljøstyrelsens Kemikaliekontrol og Tage Sørensen, Rådgivende Ingeniører A/S, oktober 1987.

**Tsien, H., G. A. Brusseau, R. S. Hanson og L. P. Wackett.** 1989. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**. 3155-3161.

**Vannelli, T., H. Logan, D. M. Arciero og A. B. Hooper.** 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**. 1169-1171.

**Vogel, T.M., Criddle, C.S. & McCarty, P.L., 1987.** Transformation of Halogenated Aliphatic Compounds. *Environ. Sci. Technol.*, **21** 722-736.

**Vogel, T. M. og P. L. McCarty.** 1985. Biotransformations of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbondioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**. 1080-1083.

**Vogel, T. M. og P. L. McCarty.** 1987. Abiotic and biotic transformations of 1,1,1-trichloroethane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **21**. 1208-1213.

**Wackett, L. P., G. A. Brusseau, S. R. Householder, og R. S. Hanson. 1989.** Survey of Microbial Oxygenases: Trichloroethylene Degradation by Propane-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55.** 2960-2964.

**Wackett, L. P., og D. T. Gibson. 1988.** Degradation of Trichloroethylene by Toluene Dioxygenase in Whole-Cell Studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **49.** 1080-1083.

**Warncke, E. 1980.** Spring areas: Ecology, vegetation and comments on similarity coefficients to plant communities, *Holanct. Ecol.* **3.** 233-308.

**Wilson, J. T., and B. H. Wilson. 1985.** Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49:**242-243.



## LISTE OVER UDGIVELSER OMHANDLENDE SKRYDSTRUPPROJEKTERNE

**Aamand, J.** 1988. Mikrobiel omdannelse af chlorerede aliphatiske opløsningsmidler under denitrificerende og methanogene forhold. Afdeling for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.

**Aamand, J., H.-J. Albrechtsen og T. Madsen.** 1989. Laboratorieundersøgelser af nedbrydningspotentialer i forskellige podematerialer. Forprojekt til ON SITE rensning af grundvandet ved Skrydstrup Specialdepot. Forsøgsnotater, 20. januar 1989. Afdeling for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.

**Andersen, J. N. og K. Broholm.** 1990. Biologisk rensning - On-site anlægget ved Skrydstrup. Indlæg til møde om klorerede opløsningsmidler - forurening og afværgeforanstaltninger. Afholdt af ATV-komiteen vedrørende grundvandsforurening. Oktober 1990.

**Broholm K., B. K. Jensen, T. H. Christensen and Lajla Olsen.** 1990. Toxicity of 1,1,1-trichloroethane and trichloroethene on a mixed culture of methane-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2488-2493.

**Broholm K., T. H. Christensen, B. K. Jensen.** 1991. Laboratory feasibility studies on biological in-situ treatment of a sandy soil contaminated with chlorinated aliphatics. Environmental Technology. 12: 279-289.

**Broholm K., T. H. Christensen and B. K. Jensen.** 1991. The diversity of eight mixed cultures of methane oxidizing bacteria with respect to degradation of TCE. Sendt til Water Research, februar 1991.

**Broholm K., T. H. Christensen and B. K. Jensen.** 1991. Modelling TCE degradation by a mixed culture of methane-oxidizing bacteria. Sendt til Water Research, april 1991.

**Broholm, K.** 1989. Forprojekt: Aerob nedbrydning af klorerede alifater. Forsøgsnotater, 30. januar 1989. Laboratoriet for teknisk Hygiejne, Danmarks Tekniske Højskole.

**Cleeman, M.** 1988. Perkolat fra opsamlingsdepot. Miljøstyrelsens analytisk kemiske laboratorium.

**Jensen, E. D., J. N. Andersen og T. Vinberg.** 1990. Rensning af forurenede grundvand fra kemikalieaffaldsdepot. Vandteknik nr. 3, 1990.

**Kemp & Lauritsen A/S.** 1989. Skrydstrup specialdepot. Projekt 1. On-site vandrensning. Statusnotat til Lossepladsprojektet. Fase 1. November 1989.

**Kemp & Lauritsen A/S.** 1991. Skrydstrup specialdepot. Projekt 1. On-site biologisk nedbrydning af klorerede alifater i grundvand. Afrapportering til Lossepladsprojektet. Maj 1991.

**Kjeldsen, P., K. Broholm og T. Larsen.** 1989. Bestemmelse af antracitkuls sorptionskapacitet overfor trichlorethylen og 1,1,1-trichlorethan. Udført på Laboratoriet for teknisk Hygiejne, Danmarks Tekniske Højskole.

**Lossepladsprojektet.** 1987. Nedbrydelighed af miljøfremmede organiske stoffer. U1. Oktober 1987.

**Miljøstyrelsen.** 1988. Miljøprojekt nr. 93. Mikrobiel nedbrydning af miljøfremmede stoffer i grundvand.

**Nielsen, J. C.** 1990. Anvendelse af methan-oxiderende bakterier til rensning af grundvand, der er forurenet med chlorerede alifater. Afdeling for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet.

**Nyeland, B.** 1989. Forureningskomponenter i opsamlingsdepotet Skrydstrup. Danmarks Miljøundersøgelser.

**Strøbæk, N.** 1989. Skrydstrup specialdepot - erfaringer fra undersøgelser og afværgeforanstaltninger. Udredningsrapport U7. December 1989.

**Sønderjyllands amtskommune.** 1986. Skrydstrup Specialdepot, reg.nr. 543-01. Beskrivelse og betingelser for anlæg af opsamlingsdepot. Juli 1986.

**Sønderjyllands amtskommune.** 1986. Skrydstrup Specialdepot, reg.nr. 543-01. Beskrivelse og betingelser for bortgravning af kemikalieaffald. Juli 1986.

**Sønderjyllands amtskommune.** 1987. Skrydstrup kemikalieaffaldsdepot, reg.nr. 543-01. Fase 3.3 Litteraturundersøgelse. Maj 1987.

**Sønderjyllands amtskommune.** 1987. Skrydstrup kemikalieaffaldsdepot, reg.nr. 543-01. Rapport om anlæg af opsamlingsdepot og bortgravning af kemikalieaffald i efteråret 1986. Maj 1987.

**Sønderjyllands amtskommune.** 1987. Skrydstrup opsamlingsdepot. Rapport over indkøringsperiode. Maj 1987.

**Sønderjyllands amtskommune.** 1987. Skrydstrup opsamlingsdepot. Rapport over indkøringsperiode II. Oktober 1987.

## UDGIVNE RAPPORTER

I forbindelse med LOSSEPLADSPROJEKTET er der med denne rapport ialt udgivet følgende rapporter:

### HYDROGEOLOGI

EN REGIONAL GEOLOGISK MODEL FOR OMRÅDET VED VEJEN, Institut for Teknisk Geologi, DTH (Rapport H0-1, 20 sider), december 1987. ISBN 87-503-7079-0.

SEVA: PC-DATABASE FOR GEOLOGI, HYDROLOGI OG VANDKVALITET, Institut for Teknisk Geologi, DTH (Rapport H0-2, 46 sider), december 1990, ISBN 87-503-8915-7.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: LAGFØLGEBORINGER, Geoteknisk Institut (Rapport H1, 122 sider), juli 1990, ISBN 87-503-8183-0.

VEJEN INJEKTIONSFORSG: HYDROGEOLOGI, Laboratoriet for teknisk Hygiejne, Danmarks Geologiske Undersøgelse m. fl. (Rapport H2, 168 sider), juni 1991, ISBN 87-503-9211-5.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: RESERVOIRFORHOLD OG FORURENINGSUDBREDELSE BESTEMT VED BOTESAM-METODEN, Danmarks Geologiske Undersøgelse (Rapport H5, 125 sider), oktober 1990, ISBN 87-503-8736-7.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: POTENTIALEFORHOLD, Geoteknisk Institut (Rapport H6, 121 sider), maj 1991, ISBN 87-503-9110-0.

BOTESAM OG SNEGLEBORING: SAMMENLIGNENDE UNDERSØGELSER, Laboratoriet for Geofysik (Århus Universitet), Danmarks Geologiske Undersøgelse og Lossepladsprojektets sekretariat (Rapport H7, 47 sider), oktober 1991, ISBN 87-503-9352-9.

EVALUERING OG UDVIKLING AF METODER TIL PRØVETAGNING OG FELTANALYSE AF ANOXISK GRUNDEVAND, Institut for Teknisk Geologi, DTH (Rapport H8, 82 sider), oktober 1990, ISBN 87-503-8738-3.

HYDRAULIK OG STOFTRANSPORT I EN OPSPRÆKKET KALKBJERGART, Danmarks Geologiske Undersøgelse (Rapport H9, 70 sider), maj 1991, ISBN 87-503-9137-2.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: GEOLOGISKE FORHOLD, Danmarks Geologiske Undersøgelse (Rapport H10, 100 sider), december 1989, ISBN 87-503-8182-2.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: FYSISK-KEMISK SEDIMENTKARAKTERISERING, Institut for Geologi og Geoteknik (Rapport H11, 55 sider), oktober 1991, ISBN 87-503-9354-5.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: UORGANISK GRUNDEVANDSKVALITET, Danmarks Geologiske Undersøgelse (Rapport H12/13, 82 sider), december 1990, ISBN 87-503-8916-5.

### FORURENINGSKEMI

AMTSKOMMUNALE UNDERSØGELSER AF GRUNDEVANDSFORURENING VED GAMLE LOSSEPLADSER, Laboratoriet for teknisk Hygiejne (Rapport P0-1, 72 sider), december 1990, ISBN 87-503-8918-1.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: ORGANISK GRUNDEVANDSKVALITET OG ANALYSEUDVIKLING, Vandkvalitetsinstituttet (Rapport P1, 57 sider), maj 1991, ISBN 87-503-9093-7.

ØKOTOKSIKOLOGISKE METODER TIL UNDERSØGELSE AF FORURENET GRUNDEVAND - LITTERATURUNDERSØGELSE, Vandkvalitetsinstituttet (Rapport P2-1, 56 sider), maj 1988, ISBN 87-503-7323-4.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: PERKOLATUDSIVNING, Laboratoriet for teknisk Hygiejne, DTH (Rapport P3, 180 sider), maj 1991, ISBN 87-503-9094-5.

SORPTION AF ORGANISKE STOFFER, Laboratoriet for teknisk Hygiejne, Danmarks Tekniske Højskole (Rapport P5-1, 85 sider), juli 1988, ISBN 87-503-7322-6.

SORPTION AF ORGANISKE STOFFER I AKVIFERER: LABORATORIEUNDERSØGELSER, Laboratoriet for teknisk Hygiejne, DTH (Rapport P5-2, 106 sider), juli 1990, ISBN 87-503-8184-9.

GRUNDEVANDSZONENS MIKROBIOLOGI, Afdelingen for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet (Rapport P6-1, 80 sider), januar 1988, ISBN 87-503-7118-5.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: GRUNDEVANDSZONENS MIKROBIOLOGI, Afdelingen for Generel Mikrobiologi, Københavns Universitet, (Rapport P6-2, 90 sider), december 1989, ISBN 87-503-8183-0.

#### MATEMATISK MODELLERING

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: MATEMATISK MODELLERING, Instituttet for Strømningsmekanik og Vandbygning/Dansk Hydraulisk Institut (Rapport M1/2, 160 sider), februar 1991, ISBN 87-503-8972-6.

OPERATIONALISERING AF EN TRE-DIMENSIONAL STOFTRANSPORTMODEL, Dansk Hydraulisk Institut (Rapport M4/7, 88 sider), februar 1991, ISBN 87-505-8971-8.

#### AFVÆRGEFORANSTALTNINGER

OVERSIGT OVER DANSKE OG UDENLANDSKE AFVÆRGEFORANSTALTNINGER, Vandkvalitetsinstituttet (Rapport R0-1, 82 sider), december 1990, ISBN 87-503-8917-3.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: IN-SITU MÅLING AF NEDBRYDNINGSPOTENTIALER I GRUNDEVANDSZONEN, Laboratoriet for teknisk Hygiejne (Rapport R2-1, 30 sider), november 1991, ISBN 87-503-9456-8.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: NEDBRYDNING AF MCPP I GRUNDEVANDSZONEN, Laboratoriet for teknisk Hygiejne (Rapport R2-2, 63 sider), juni 1991, ISBN 87-503-9213-1.

AFVÆRGE PUMPNING VED SEPARATIONSPUMPNING - FASE 1: DEMONSTRATIONSMODEL, Danmarks Geologiske Undersøgelse (Rapport R3-1, 67 sider), december 1990; ISBN 87-503-8920-3.

UNDERSØGELSER VED VEJEN LOSSEPLADS: TRE-DIMENSIONAL MODELLERING AF ALTERNATIVE AFVÆRGEFORANSTALTNINGER, Dansk Hydraulisk Institut (Rapport R4, 45 sider), maj 1991, ISBN 87-503-9095-3.

#### AFVÆRGEUDVIKLINGSRAPPORTER

BIOLOGISK NEDBRYDNING AF KLOREREDE OPLØSNINGSMIDLER - PROJEKTER GENNEFØRT VED SKRYDSTRUP SPECIALDEPOT, Afdeling for General Mikrobiologi, Laboratoriet for teknisk Hygiejne med flere (Rapport A1, 81 sider), november 1991. ISBN 87-503-9453-3.

NEDBRYDNING AF DIESELolie I UMÆTTET JORD: LABORATORIEUNDERSØGELSER, Laboratoriet for teknisk Hygiejne, Cowiconsult og Dansk Teknologisk Institut (Rapport A2, 85 sider), november 1991. ISBN 87-503-9454-1.

AFVÆRGEpumpning ved Separationspumpning - FASE 2 & 3: FELTFORSØG, Danmarks Geologiske Undersøgelse/Geoteknisk Institut (Rapport A3, 120 sider), maj 1991. ISBN 87-503-9111-9.

#### UDREDNINGSRAPPORTER

NEDBRYDELIGHED AF MILJØFREMMEDE ORGANISKE STOFFER, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH (Rapport U1, 105 sider), oktober 1987. ISBN 87-503-7017-0.

FORURENEDE INDUSTRIGRUNDE, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH (Rapport U2, 130 sider), januar 1988, ISBN 87-503-7081-2.

GRUNDTVANDSPRØVETAGNING OG FELTMÅLING, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH, (Rapport U3, 222 sider), april 1989, ISBN 87-503-7817-1.

FORURENEDE GASVÆRKSGRUNDE, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH, (Rapport U4, 221 sider), november 1989, ISBN 87-7491-315-8.

ANVENDELSE AF PHOTOIONISATIONSDETEKTOR VED UNDERSØGELSE AF JORDFORURENING, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH, (Rapport U5, 52 sider), december 1989, ISBN 87-503-8173-3.

KILDER TIL INDUSTRIKORTLÆGNING, Geokon A/S, (Rapport U6, 140 sider), december 1989, ISBN 87-503-8174-1.

SKRYDSTRUP SPECIALDEPOT - Erfaringer fra undersøgelser og afværgeforanstaltninger, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH, (Rapport U7, 60 sider), december 1989, ISBN 87-503-8174-1.

JORDPRØVETAGNING PÅ FORURENEDE GRUNDE - Strategier, metoder og håndtering, Lossepladsprojektets sekretariat, DTH (Rapport U8, 110 sider), april 1991, ISBN 87-503-9043-0.